

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
Sección de Biológicas. inéditas



TESIS DOCTORAL

**Relaciones entre el estado de nutrición del abeto rojo y su
resistencia frente al Fomes annosus (Fr.) Cooke**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Maria del Pilar Díaz Palacio

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310045539

T 632

DIA

rel

Universidad de Madrid - Facultad de Ciencias

Relaciones entre el estado de nutrición del abeto rojo y su
resistencia frente al *Fomes annosus* (Fr.) Cooke

Memoria presentada para aspirar
al grado de Doctor por

María del Pilar Díaz Palacio

Madrid, octubre 1971



2.28.222

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Instituto de Edafología y Ecología forestal de la Universidad de Munich, bajo la dirección del Profesor Dr. W. Laatsch, a quien deseo expresar mi más cordial agradecimiento por el apoyo y la ayuda incondicionales que me ha dispensado. Asimismo quiero hacer constar mi gratitud a todo el personal del Instituto, especialmente al Dr. G. Wenzel y al Profesor Dr. K. E. Rehfuess por sus valiosas orientaciones, así como a la Sra. Heibl por su eficaz colaboración en la parte experimental.

Mi reconocimiento también al Profesor Dr. A. Martín Municio por haber tenido la bondad de apadrinar este trabajo.

Finalmente, agradezco a la Deutsche Forschungsgemeinschaft la ayuda económica concedida dentro del programa "Rotfäule der Fichte".

Sumario

1.	<u>Introducción</u>	1
2.	<u>Parte teórica.</u>	8
2.1	Resistencia natural de los tejidos vegetales al ataque de los hongos.	9
2.1.1	Las sustancias fungitóxicas contenidas en la madera, principal fuente de resisten - cia a la pudrición	9
2.1.1.1	Naturaleza química.	10
2.1.1.2	Principios de la acción fungitó- xica.	16
2.1.1.3	Ensayos toximétricos.	17
2.1.2	Otros mecanismos de resistencia.	18
2.2	Relación entre el contenido en sustancias fungi- tóxicas de algunas coníferas y su resistencia a la pudrición.	20
2.2.1	Resistencia del duramen.	20
2.2.2	Respuesta dinámica de la albura al ataque de los hongos.	22
2.3	Las sustancias fungitóxicas del abeto rojo.	26
2.3.1	La acción inhibidora del líber frente al Fomes annosus. Toxicidad de algunos de sus componentes.	27

2.3.2	La composición química de la resina y sus propiedades fungitóxicas	31
2.3.3	La madera del abeto rojo y su respuesta a la infección del Fomes annosus	35
2.4	Relaciones entre los factores ecológicos del hábitat forestal, el estado de nutrición del abeto rojo y la "pudrición del duramen"	37
2.4.1	Influencia de las sequías periódicas del suelo.	39
2.4.2	Influencia de un suelo con un alto contenido en carbonatos	40
2.4.3	Influencia de un suelo muy rico en nitrógeno	43
3.	<u>Material y métodos.</u>	45
3.1	Análisis del líber. Extracción y determinación de su contenido en sustancias inhibidoras y estimulantes del crecimiento del Fomes annosus. . . .	46
3.1.1	Procedencia del material. Toma y preparación de las muestras	46
3.1.2	Preparación de los extractos	48
3.1.2.1	Extracción con cloroformo	48
3.1.2.2	Extracción etanol-agua (1:1)	49
3.1.2.3	Reparto del extracto de etanol - agua en el sistema éter/agua.	50

3.1.3	Examen cromatográfico de los extractos . .	51
3.1.3.1	Cromatografía sobre papel	51
3.1.3.2	Cromatografía de capa fina. . . .	52
3.1.4	Análisis cuantitativo de los constituyen-	
	tes fenólicos.	53
3.1.4.1	Determinación cuantitativa de los	
	polifenoles en la fase etérea . .	54
3.1.4.2	Determinación cuantitativa de los	
	polifenoles en la fase acuosa . .	55
3.1.5	Determinación cuantitativa de azúcares . .	58
3.1.6	Determinación cuantitativa de almidón. . .	59
3.1.7	Determinación del contenido en nitrógeno .	60
3.1.7.1	Determinación del nitrógeno total. . . .	60
3.1.7.2	Análisis de aminoácidos	61
3.1.7.3	Hidrólisis de péptidos.	62
3.2	Ensayos con la resina	63
3.2.1	Toma y preparación de las muestras	63
3.2.2	Examen cromatográfico.	64
3.3	Ensayos con la madera	64
3.3.1	Toma y preparación de las muestras	64
3.3.2	Preparación de los extractos	65
3.3.3	Examen cromatográfico de los extractos . .	67
3.4	Ensayos biológicos.	69
3.5	Análisis de las acículas.	70

3.5.1	Toma de muestras y preparación de la solución-base.	71
3.5.2	Determinación de fósforo	72
3.5.3	Determinación de potasio, calcio y magnesio.	73
3.5.4	Determinación colorimétrica de manganeso .	74
3.5.5	Determinación colorimétrica de hierro. . .	75
3.5.6	Determinación de nitrógeno	76
3.6	Determinación del contenido de agua en el suelo .	78
4.	<u>Resultados y discusión</u>	79
4.1	Investigaciones sobre el líber.	80
4.1.1	Consideraciones acerca de los métodos empleados en la determinación cuantitativa de sustancias inhibidoras y sustancias estimulantes del crecimiento del <u>Fomes annosus</u>	81
4.1.1.1	Extracción del líber, propiedades fungitóxicas de los extractos y examen cromatográfico de los mismos.	81
4.1.1.2	Determinación de fenoles.	91
4.1.1.3	Determinación de azúcares	95
4.1.1.4	Determinación de almidón.	96
4.1.1.5	Determinación de aminoácidos.	97

4.1.2	Variación de la composición química de los extractos y de la acción inhibidora del líber del abeto rojo bajo el influjo de diversos factores.	97
4.1.2.1	Influencia de la posición de las muestras en el árbol. . . .	100
4.1.2.2	Influencia de la edad de los árboles	107
4.1.2.3	Variación de la composición química de los extractos y del efecto inhibido del líber frente al Fomes annosus a través del año	110
4.1.3	Relaciones entre el estado de nutrición del abeto rojo y la acción inhibidora de su líber frente al Fomes annosus	117
4.1.3.1	Influencia de las sequías periódicas del suelo.	118
4.1.3.2	Influencia de un suelo rico en carbonatos	132
4.1.3.3	Influencia de un suelo muy rico en nitrógeno	139
4.2	Resultados de los ensayos llevados a cabo con oleorresina	165

4.2.1	Acción inhibidora de la oleorresina sobre el Fomes annosus.	166
4.2.2	Influencia de la sequía del suelo sobre la exudación de oleorresina	169
4.2.3	Influencia de un suelo rico en carbonatos: deficiencia de los abetos rojos en manganeso	172
4.3	Resultados de los ensayos llevados a cabo con la madera	175
4.3.1	Ensayos biológicos con el Fomes annosus .	175
4.3.2	Extracción de la madera molida, examen cromatográfico de los extractos y propiedades fungitóxicas de los mismos.	181
5.	<u>Conclusiones.</u>	194
6.	<u>Bibliografía.</u>	204
6.1	Bibliografía por orden de referencia	205
6.2	Indice alfabético de autores	218

1. Introducción

1. Introducción

Los bosques constituyen uno de los recursos naturales renovables más importantes del mundo. Por este motivo la investigación forestal de todos los países tiene entre sus objetivos primordiales el desarrollo y la protección adecuada de esta gran fuente de riqueza con el fin de alcanzar la máxima productividad y poder aprovechar sus múltiples beneficios, tanto para la generación presente como para las futuras.

Entre los factores que más intervienen en la destrucción de la madera de los bosques destacan las enfermedades producidas por hongos y dentro de ellas ocupan un lugar predominante las ocasionadas por el *Fomes annosus* (Fr.) Cooke, un típico parásito de raíz. Aunque este hongo es capaz de atacar a muchas especies arbóreas, los daños más importantes son los que produce en las coníferas. En algunas de ellas, como en el género *Pinus*, el ataque sufrido por la raíz puede causar la muerte del árbol. En otras, como en el caso del abeto rojo, la infección asciende desde las raíces a través del duramen originando la pudrición de éste, y, aunque el árbol pueda seguir viviendo, la madera sin embargo pierde su valor.

Las áreas forestales infectadas por este parásito cubren grandes extensiones con las consiguientes pérdidas económicas. BJÖRKMAN⁽¹⁾ en la apertura de la 3ª Conferencia Interna

cional sobre *Fomes annosus*, celebrada en Aarhus (Dinamarca) en 1968, habla de un verdadero "problema del *Fomes annosus*".

Dentro de Europa, los Países Escandinavos y Alemania son los más afectados, y por esta causa en ellos donde se le ha dedicado una mayor atención. Aunque en menor escala, también en España se deja sentir el problema. BENITO MARTINEZ y TORRES JUAN⁽²⁾ describen en una monografía las principales enfermedades que atacan a las coníferas en nuestro país, y al referirse concretamente a los daños originados en ellas por el *Fomes annosus* los califican de importantes y su aparición de frecuente. Las especies principalmente afectadas son, según estos autores, *Abies alba* (Lérida), *Pinus laricio* (Jaén), *Pinus sylvestris* (Ávila, Burgos, Madrid, Segovia) y *Pinus radiata* (Vizcaya).

América del Norte está asimismo interesada en la lucha contra este hongo.

La protección de cada especie forestal contra el ataque del *Fomes annosus* supone un conocimiento lo más perfecto posible de las condiciones en que esa determinada especie es infectada, para lo cual es necesario examinar el problema en sus múltiples facetas.

Las investigaciones consignadas en este trabajo son una contribución al estudio de la "pudrición del duramen" en el abeto rojo (*Picea abies* Karst.), la especie más afectada en Alemania. La enfermedad puede ser originada no sólo por el *Fomes an-*

nosus sino también por otros hongos, tales como *Armillaria mellea* (Quel.) y *Polyporus abietinus* (Fr.) (SCHÖNHAR⁽³⁾), sin embargo el primero es el más frecuente y el que ha recibido por tanto mayor atención. Estas investigaciones no constituyen sin embargo algo aislado, sino que forman parte de un amplio programa organizado por la Deutsche Forschungsgemeinschaft en 1967 con el fin de estudiar la enfermedad desde distintos puntos de vista, y que engloba a varios equipos de investigadores. Las cuestiones fundamentales tratadas en este programa (ZYCHA y ULRICH⁽⁴⁾) junto con la reseña bibliográfica de los resultados publicados hasta este momento son las que se citan a continuación:

1. Naturaleza y evaluación de los daños ocasionados por la "pudrición del duramen"; especies de hongos que la originan (ZYCHA y DIMITRI⁽⁵⁾, ZYCHA y ULRICH⁽⁴⁾, SCHÖNHAR^(3,6)).
2. Relaciones entre la propagación de la enfermedad, los factores ecológicos del hábitat forestal y el estado de nutrición del abeto rojo (LAATSCH et al.⁽⁷⁾, LAATSCH⁽⁸⁾, K.E. REHFUESS^(9,10), ALCUBILLA^(11,12), WENZEL y DIAZ-PALACIO⁽¹³⁾, ALCUBILLA⁽¹⁴⁾, WENZEL et al.⁽¹⁵⁾, WENZEL y KREUTZER⁽¹⁶⁾, DITTRICH⁽¹⁷⁾, ALCUBILLA et al.⁽¹⁸⁾).
3. Las vías de infección del *Fomes annosus* (DIMITRI^(19,20), BRAUN y LULEV^(21,22), DIMITRI et al.⁽²³⁾).
4. El *Fomes annosus* y su acción sobre la madera (COURTOIS⁽²⁴⁾),

COURTOIS y BRAUN⁽²⁵⁾).

5. Medidas a tomar para evitar los daños de la "pudrición del duramen".

Nuestro trabajo está encuadrado dentro del 2º punto, en un aspecto muy interesante: las relaciones entre la nutrición de los árboles y su resistencia a la enfermedad. En muchos países se ha observado que la "pudrición del duramen" del abeto rojo se presenta con frecuencia en hábitats forestales con unas características ecológicas determinadas. Para explicar este fenómeno ha propuesto LAATSCH la siguiente hipótesis de trabajo:

"La penetración del parásito en las raíces del abeto rojo depende no sólo de la virulencia del hongo, de sus posibilidades de nutrición y de la existencia o no de sus antagonistas, sino también, y en gran medida, de la predisposición de la planta. A esta predisposición contribuye ciertamente la formación de grietas en la corteza de las raíces, como afirma BRAUN⁽²⁶⁾, pero también una concentración insuficiente de sustancias inhibidoras en el líber de aquéllas. El estado de nutrición del abeto rojo bajo los factores ecológicos de los complejos ambientales en los que se suele presentar la "pudrición del duramen" no permite una síntesis suficiente de dichas sustancias, sobre todo en épocas de escaso abastecimiento de agua" (LAATSCH et al.⁽⁷⁾).

LAATSCH señala como hábitats forestales típicos para esta enfermedad:

- aquéllos en los que el suelo experimenta sequías pe-

riódicas y las raíces se encuentran muy superficiales.

- los que poseen un suelo con una alta concentración en carbonatos o bien atravesado periódicamente por corrientes de agua bicarbonatada.
- los que presentan un suelo muy rico en nitrógeno.

Cuando en un hábitat forestal coinciden total o parcialmente las tres características anteriores, el peligro de infección es particularmente grande. En la parte general trataremos detenidamente estos puntos.

Para comprobar la hipótesis anteriormente citada bajo el influjo de los factores acabados de mencionar, era necesario primeramente la identificación de las principales sustancias inhibitoras del crecimiento del hongo contenidas en el líber del abeto rojo, tarea realizada por ALCUBILLA⁽¹⁴⁾. Después ha sido preciso elaborar métodos para la determinación cuantitativa de dichas sustancias, estudiar su variación con diversos factores, como la estación del año, la edad de los árboles, etc..., para pasar luego a examinar su concentración en relación con el hábitat forestal. Ahora bien, la barrera, que podíamos llamar química, que oponen los árboles al ataque de los hongos no depende tan sólo de la concentración de las sustancias tóxicas al patógeno sino que es debida a un delicado balance entre éstas y las sustancias que favorecen su crecimiento (FLOOD y KIRKHAM⁽²⁷⁾, OSBORNE y THROWER⁽²⁸⁾). El resultado de la interacción de ambas determina en cada caso particular el efecto inhibitor del líber

del abeto rojo. El núcleo central del presente trabajo está constituido precisamente por el estudio de la variación de dicho efecto inhibitor en relación con el estado de nutrición de los árboles, bajo aquellas condiciones ecológicas en que se suele presentar la "pudrición del duramen".

Como en toda investigación, las cuestiones iniciales han planteado otras nuevas que ha sido necesario examinar, bien por estar íntimamente relacionadas con ellas o por abrir nuevos horizontes a la interpretación del problema.

Entre las primeras se encuentra la acción inhibitora de la resina y su variación con los factores del medio ambiente, que ha sido otra de las facetas de resistencia estudiadas.

Entre las segundas, un examen previo de la madera del abeto rojo, antes y después del ataque del patógeno, como posible fuente de resistencia a la pudrición. Este punto, que constituye un pequeño capítulo adicional, es sin embargo de gran interés para futuras investigaciones.

La aplicación de los resultados de este estudio en el cultivo de razas más resistentes al ataque de los hongos y en la elección de un hábitat forestal adecuado esperamos que sea una ayuda eficaz para las nuevas repoblaciones y en su medida para las plantaciones ya existentes.

2. Parte teórica

2.1 Resistencia natural de los tejidos vegetales al ataque de los hongos

Entre los numerosos problemas que se les presentan a los fitopatólogos, pocos tienen tan gran interés científico y significado práctico como el de la resistencia de los tejidos vegetales. Con esta expresión se describe el hecho de que un organismo sea menos afectado que otro en su vida y en su actividad bajo el influjo de un determinado factor perjudicial.(FUCHS⁽²⁹⁾).

Los mecanismos de resistencia puestos en juego, en el caso de un ataque producido por hongos, tienden a impedir el desarrollo del parásito, ya oponiéndose a su penetración o a su propagación, no ofreciéndole el sustrato nutritivo necesario, etc. Vamos a examinar brevemente algunos de ellos, concretándonos solamente a la madera por poseer para nuestro estudio un especial interés.

2.1.1 Las sustancias fungitóxicas contenidas en la madera, principal fuente de resistencia a la pudrición

Ya las primeras investigaciones en el terreno de la fitopatología sugieren la existencia de una relación entre la presencia de componentes tóxicos y la magnitud del crecimiento de los hongos en los tejidos vegetales (WARD⁽³⁰⁾). Esta hipótesis fue comprobada más tarde por HAWLEY et al.⁽³¹⁾ en el duramen de cier

tas especies arbóreas al encontrar que su resistencia a la pudrición era reducida por extracción con agua y otros disolventes y que dicha resistencia se correspondía con la toxicidad de los extractos obtenidos.

Los estudios actuales en este campo consideran las sustancias fungitóxicas como la principal fuente de resistencia al ataque de estos patógenos, pudiendo existir antes de la infección (RENNERFELT⁽³²⁾, RENNERFELT y NACHT⁽³³⁾, SCHEFFER y COWLING⁽³⁴⁾, ANDERSON et al.⁽³⁵⁾), o bien aparecer como consecuencia de la misma (CRUICKSHANK⁽³⁶⁾). Su acción sobre los hongos puede ser fungicida -mortal-, o bien inhibidora de su crecimiento, total o parcialmente.

2.1.1.1 Naturaleza química

La naturaleza química de estas sustancias es muy variada. En la imposibilidad de hacer aquí una relación completa de las mismas, citaremos como ejemplo algunas de las consideradas actualmente de mayor importancia.

Pertenecen principalmente a cuatro grupos: tropolones, flavonoides, estilbenos y terpenos (Tabla I).

ANDERSON et al.⁽³⁵⁾ y RUDMAN^(38,45) han medido la toxicidad para diferentes hongos xilófagos de un gran número de sustancias químicas, algunas de las cuales están consignadas en la Tabla I, comparándola con la del pentaclorofenol, uno de los fun

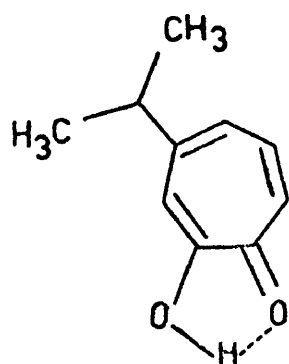
T a b l a I

Ejemplos de sustancias fungitóxicas contenidas en la madera

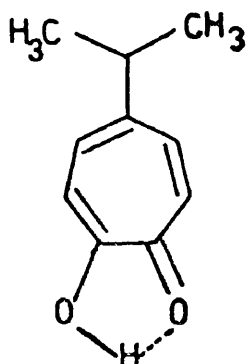
Grupo químico	Sustancia (*)	Especie arbórea	Principal fuente bibliográfica	Ensayos toxicométricos
Tropolones	β-thujaplicina	Thuja plicata	ERDTMAN et al. (37)	RUDMAN (38)
	γ-thujaplicina	"	"	"
	nootkatina	Chamaecyparis nootkatensis	ERITMAN (39)	RENNERFELT (40)
Terpenos	carvacrol	Libocedrus decurrens	ANDERSON et al. (35)	ANDERSON et al. (35)
	p-metoxicarvacrol	"	"	"
	p-metoxitimol	"	"	"
	timohidroquinona	"	"	"
Flavonoides	taxifolina	Pseudotsuga menziesii	KENNEDY (41)	RUDMAN (38)
		Larix decidua	RENNERFELT (42)	
	robinetina	Robinia pseudoacacia	FREUDENBERG y HARTMAN (43)	RUDMAN (38)
Estilbenos	pinosilvina	Pinus sylvestris	ERDTMAN (44)	RENNERFELT y NACHT (33)
	éter monometílico de pinosilvina	"	"	RUDMAN (45)
	oxiresveratrol	Maclura pomifera	BARNES et al. (46)	RUDMAN (38)
Lignanós	matairesinol	Podocarpus spicatus	ERDTMAN (47)	RUDMAN (45)

(*) Las fórmulas químicas de estas sustancias se encuentran en el apartado 2.1.1.1 del texto.

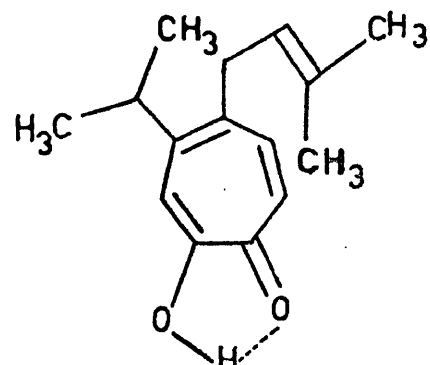
gicidas más eficaces. Según estos autores, el grupo que presenta un carácter tóxico más fuerte es el de las tropolonas; entre ellas destacan β -thujaplicina (I), γ -thujaplicina (II) y nootkatina (III).



(I)

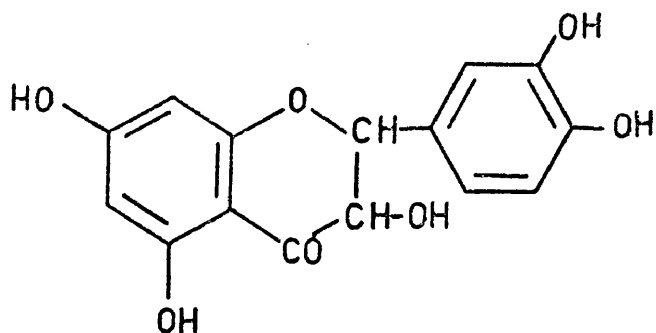


(II)

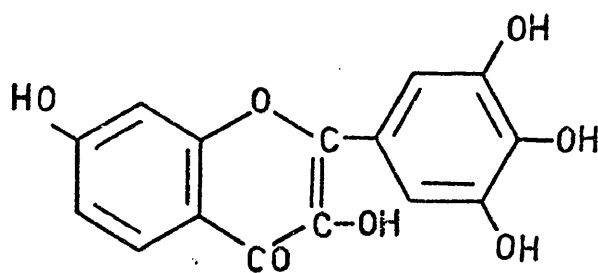


(III)

Los flavonoides, tales como la taxifolina (IV) y la robinetina (V) no son altamente fungitóxicos pero retardan la pudrición de la madera.

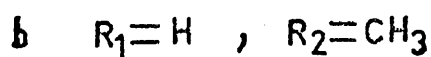
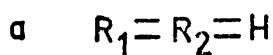
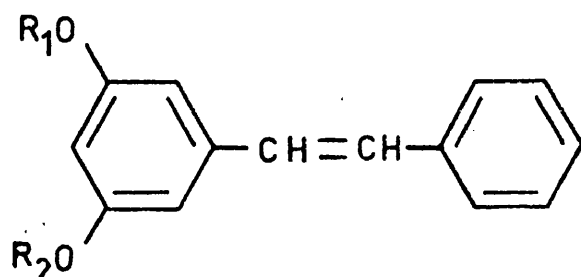


(IV)



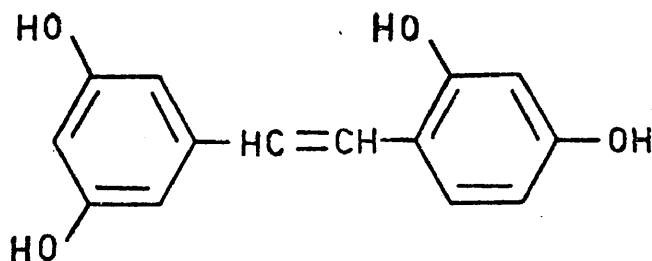
(V)

Los derivados del estilbeno tienen una acción bastante específica; mientras su toxicidad para algunos hongos es nula, para otros es muy alta incluso en pequeñas dosis. Se pueden citar la pinosilvina (VIa) y su éter monometílico (VIb).



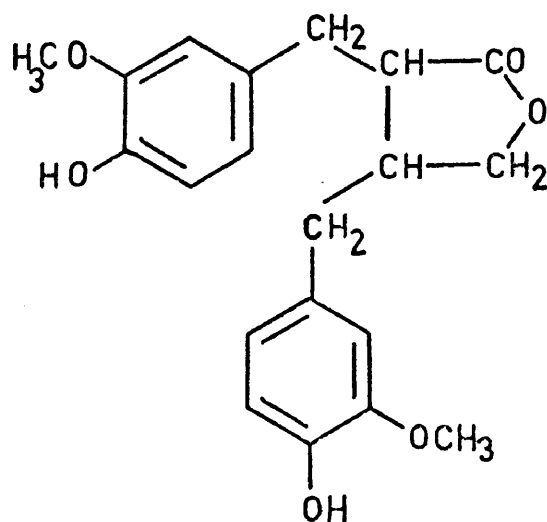
(VI)

BARNES et al.⁽⁴⁶⁾ encontraron en *Maclura pomifera* una sustancia altamente fungitóxica que identificaron como oxires-veratrol (VII)



(VII)

Otros compuestos aromáticos no pertenecientes a los grupos anteriores poseen igualmente propiedades fungitóxicas para algunos hongos xilófagos. Por ejemplo, el matairesinol (VIII)

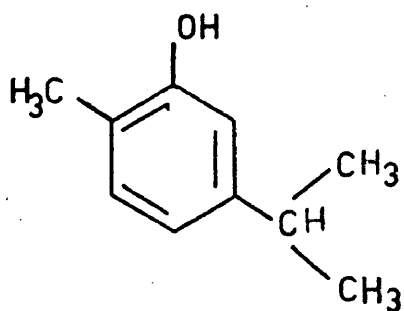


(VIII)

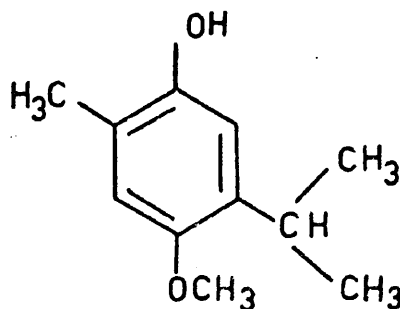
de la madera de *Podocarpus spicatus* ("matai"), que se ha mostrado fuertemente tóxico para *Lentineus lepideus* (RUDMAN⁽⁴⁵⁾).

Algunas sustancias, que individualmente no son inhibidoras de la pudrición, o lo son en pequeña escala, pueden dar lugar, al presentarse juntas en la misma madera, a una resistencia mucho mayor de la que se podría esperar como suma de sus efectos aislados. Este fenómeno, conocido con el nombre de sinergismo, es particularmente notable en la especie *Libocedrus decurrens*, entre los terpenos carvacrol (IX), p-metoxicarvacrol (X), timohidroquinona (XI) y p-metoxitimol (XII). Estos com

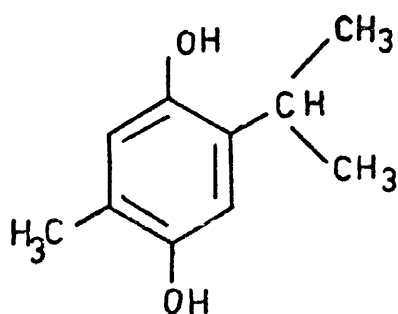
puestos muestran por separado en los ensayos de ANDERSON et al.⁽³⁵⁾ con *Poria monticola* (Mad.698) y *Lenzites trabea* (Mad.617),



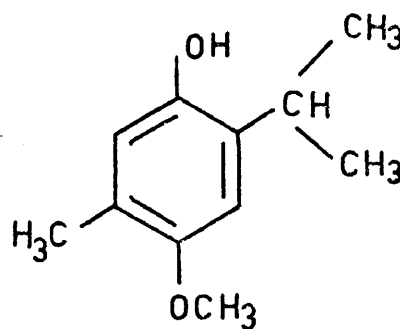
(IX)



(X)



(XI)



(XII)

una acción inhibitoria muy pequeña. La mezcla de los mismos en las proporciones en que están contenidos en esa especie arbórea ejerce sobre estos hongos un efecto letal.

Casos semejantes de sinergismo han sido observados en otros árboles (FLOOD y KIRKHAM⁽²⁷⁾). Esto induce a pensar que la resistencia a la pudrición de una determinada especie, rara

5310045539

vez se podrá explicar como causada por una sola sustancia, sino que más bien dependerá de la presencia de una mezcla de varias de ellas, junto con otros factores (CRUICKSHANK y PERRIN⁽⁴⁸⁾).

2.1.1.2 Principios de la acción fungitóxica

Los principios de la actividad fungitóxica no están suficientemente estudiados hasta el momento. La distinta naturaleza química de las sustancias fungitóxicas hace suponer que sus mecanismos de inhibición sean también muy variados. Según algunos autores (LYR⁽⁴⁹⁾), la pinosilvina y su éter monometílico, las thujaplicinas, la nootkatina y otros compuestos actúan como agentes desacopladores, dando lugar a la inhibición de la fosforilación oxidativa, principal fuente de energía para los hongos xilófagos. Algunos fenoles sintetizados artificialmente, por ejemplo el pentaclorofenol, que son usados como antisépticos de la madera, parecen actuar de modo similar.

Otras sustancias deben sus propiedades fungitóxicas a una acción específica sobre determinados enzimas de los hongos, inhibiendo su actividad oxidante. Tal es el caso de los taninos, que aunque no figuren entre los compuestos con fuerte carácter inhibidor, en algunos casos lo presentan (RYPÁČEK⁽⁵⁰⁾).

Hay hongos sin embargo que son capaces de destruir la madera a pesar de que ésta contenga sustancias tóxicas. LYR⁽⁴⁹⁾ ha logrado interpretar este hecho comprobando que algunos enzi-

mas oxidativos - como la laccasa y la tirosinasa - producidos por determinados hongos pueden reducir fuertemente el efecto tóxico de la β -thujaplicina y del éter monometílico de la pinosilvina, al producir la destrucción oxidativa de estas sustancias. Esto explica también la diferente capacidad de defensa de una misma madera frente a distintos hongos.

2.1.1.3 Ensayos toximétricos

Las sustancias fungitóxicas contenidas en la madera se pueden obtener de ésta por extracción con uno o varios disolventes, de forma simultánea o sucesiva. Es muy importante encontrar un sistema disolvente que las remueva por completo y para comprobar su eficacia se deben hacer ensayos biológicos no sólo con la madera en estado natural y los extractos procedentes de la misma, sino también con el residuo que queda después de la extracción. Si los extractos se muestran realmente tóxicos se procede al aislamiento de sus componentes individuales, para encontrar los responsables de esa toxicidad.

Los métodos más utilizados para evaluar la fungitoxicidad, tanto de la madera como de sus extractos y de los componentes de éstos, son los ensayos en agar-maltà y aquéllos en los que se emplea directamente la madera como sustrato.

Los primeros tienen la ventaja de su sencillez, siendo muy útiles para fines comparativos; sin embargo sus resultados

son sólo un índice de lo que sucede en condiciones naturales. Por eso, para estudios críticos es preferible usar el segundo tipo de ensayos.

2.1.2 Otros mecanismos de resistencia

Aunque las sustancias tóxicas constituyen la principal fuente de resistencia de los tejidos vegetales al ataque de los hongos, existen otros factores que pueden jugar también un papel importante. Limitándonos solamente a aquellos que aumentan la resistencia alla pudrición de la madera merecen ser mencionados:

a) Mecanismo estructural de resistencia. La resistencia de ciertas gimnospermas a determinados hongos xilófagos no se ve reducida por la extracción exhaustiva de la madera con disolventes de una amplia gama de polaridad, sin embargo es mucho mayor que la que presentan algunas angiospermas en idénticas condiciones (PETTERSON y COWLING⁽⁵¹⁾). Esto lleva a pensar en un mecanismo de resistencia inherente a los constituyentes estructurales de las gimnospermas. La cantidad de lignina de las paredes celulares, su distribución, su distinta composición, pueden ser responsables de las diferencias observadas entre ambos grupos.

b) Bajo contenido en nitrógeno. El contenido en nitrógeno de la madera puede influenciar grandemente su susceptibili -

dad hacia los hongos xilófagos. La resistencia a la pudrición es mayor para bajas concentraciones (MERRILL y COWLING^(52,53)), ya que, siendo el nitrógeno un elemento fundamental para la vida de estos patógenos, su deficiencia no les permite un crecimiento normal.

c) Humedad. La humedad es absolutamente necesaria para toda la actividad vital de los hongos xilófagos; pero las exigencias de las distintas especies de hongos varían mucho de unas a otras. Por otra parte, es muy difícil determinar experimentalmente la humedad óptima para el desarrollo de estos hongos, ya que en su acción sobre la madera producen agua de metabolismo y elevan así el porcentaje de humedad del sustrato leñoso en el cual vegetan. En general, un contenido de humedad de 35-50% es el más favorable para su desarrollo. La humedad mínima necesaria es de un 22-24%, por lo que los árboles que presentan un contenido más bajo resisten más fácilmente al ataque.

La combinación de varios de estos mecanismos de resistencia junto con la acción inhibidora de las sustancias fungitóxicas y otros factores, determinan en cada caso particular la resistencia del árbol frente al ataque de los patógenos (SCHEFFER y COWLING⁽³⁴⁾).

2.2 Relación entre el contenido en sustancias fungitóxicas de algunas coníferas y su resistencia a la pudrición

Nos vamos a referir en este apartado solamente a aquellas coníferas que están consideradas en la bibliografía como resistentes, o por lo menos moderadamente resistentes. La especie *Picea abies*, poco resistente, será estudiada más adelante. Hablaremos por separado de la resistencia que presenta el duramen y la que ofrece la albura, por ser de distinta naturaleza.

2.2.1 Resistencia del duramen

RENNERFELT y NACHT⁽³³⁾, al investigar la actividad fungitóxica de las sustancias contenidas en el duramen de ciertas coníferas, destacan que las especies más resistentes a la pudrición son también aquellas cuyos extractos muestran una gran fungitoxicidad. Así, por ejemplo, los obtenidos del duramen de *Pinus sylvestris* -una especie bastante resistente- son fuertemente tóxicos frente a muchos hongos xilófagos, inhibiendo su crecimiento incluso a concentraciones muy bajas, del orden de un 0,001%. ERDTMAN⁽⁴⁴⁾ había identificado entre los componentes de esos extractos la pinosilvina y su éter monometílico (Tabla I), dos derivados del estilbeno, con propiedades fungitóxicas, como ya se ha mencionado. Probablemente, sin embargo, no son los únicos responsables de la resistencia de esta especie (LOMAN⁽⁵⁴⁾).

De la madera de *Thuja plicata* -muy resistente- aislaron ANDERSON y SHERRAD⁽⁵⁵⁾ una sustancia cristalina de carácter ácido que fue identificada más tarde por ERDTMAN et al.⁽³⁷⁾ como una mezcla de α , β , y γ -thujaplicina (Tabla I). Estos compuestos poseen una toxicidad comparable a la del pentaclorofenol. Al mismo grupo químico, tropolonas, pertenece la nootkatina, que se encuentra en el duramen de la mayoría de las especies de *Cupressus*, también muy resistentes.

Como dijimos anteriormente (2.1.1.2), también la madera de *Libocedrus decurrens*, otra de las especies más resistentes, contiene una cantidad considerable de sustancias tóxicas (ANDERSON et al.⁽³⁵⁾).

Las especies *Pseudotsuga*, clasificadas entre las moderadamente resistentes, contienen en su duramen taxifolina (KENNEDY⁽⁴¹⁾), una sustancia muy tóxica en los ensayos en agar-malta, lo que llevó a este autor a la conclusión de que la resistencia a la pudrición de la madera de estas especies era debida principalmente a la acción inhibidora de este compuesto. Los ensayos llevados a cabo por RUDMAN⁽³⁸⁾ con probetas de madera han demostrado sin embargo que en estas condiciones -más acordes con las naturales- la sustancia presenta una toxicidad débil y a todas luces insuficiente para ser la única responsable de la resistencia de estas especies, en las cuales su concentración es muy baja, alrededor de 1%. RUDMAN piensa en un mecanismo de resisten-

cia estructural, que junto con la pequeña contribución de la taxifolina serían los responsables de la resistencia observada.

2.2.2 Respuesta dinámica de la albura al ataque de los hongos

En los árboles, antes de la tala, la albura es generalmente más resistente que el duramen a la pudrición causada por los hongos xilófagos. En cambio, cuando los árboles son talados ocurre precisamente lo contrario: la albura es destruida por lo general más fácilmente que el duramen.

Estos dos fenómenos, a primera vista contradictorios, en encuentran su explicación en la constitución de ambos. La albura es capaz de ofrecer una respuesta dinámica a la infección, por contener parénquima vivo; pero al ser talado el árbol e ir perdiendo el parénquima su vitalidad, como por otra parte la albura no posee en general sustancias tóxicas, es más fácilmente in vadida que el duramen, el cual con frecuencia presenta un conte nido mayor en estos compuestos.

De este modo podemos hablar de una barrera estática a la infección, preformada en el huésped -duramen-, y de una barrera dinámica, resultante de la respuesta fisiológica del parénquima vivo -albura-.

Esta respuesta dinámica de la albura consiste principalmente en la acumulación de sustancias que de forma habitual no se encuentran entre sus constituyentes y que presentan carácter

fungitóxico.

Los primeros postulados sobre este mecanismo de defensa en las plantas -formación de antibióticos como respuesta a la infección- se deben a MÜLLER y sus colaboradores, (MÜLLER y BÖRGER^(56,57), MÜLLER et al.⁽⁵⁸⁾, MEYER⁽⁵⁹⁾) que proponen para esas sustancias el nombre de "Phytoalexin". MÜLLER⁽⁶⁰⁾ define las Phytoalexinas como "antibióticos producidos por una interacción entre dos sistemas metabólicos -huésped y parásito- y que inhiben el crecimiento de microorganismos patogénicos en las plantas. Más recientemente CRUICKSHANK⁽³⁶⁾ y CRUICKSHANK y PERRIN⁽⁴⁸⁾ han revisado la teoría de MÜLLER y han sugerido algunas modificaciones, que mantienen sin embargo los puntos fundamentales. Se han encontrado Phytoalexinas en muchos tipos de plantas: diferentes variedades de patatas, arroz, orquídeas... Una discusión de las principales investigaciones realizadas en este campo entre 1965 y 1970 ha sido publicada por CRUICKSHANK et al.⁽⁶¹⁾.

En las especies arbóreas la investigación de este tipo de compuestos es relativamente moderna, aunque la existencia de barreras dinámicas frente a la infección habían sido postuladas con alguna anterioridad (ZYCHA⁽⁶²⁾). Para designar estos tejidos semejantes a los del duramen, que aparecen alrededor de heridas o como consecuencia de infecciones causadas por hongos, se han utilizado los términos "duramen patológico" y "madera de protección". Sin embargo la naturaleza de las sustancias conte-

nidas en ellos, causantes de las variaciones en color, etc., no ha sido examinada hasta hace pocos años. Los estudios más avanzados en este terreno son los realizados en el género Pinus.

JORGENSEN⁽⁶³⁾ encuentra que la destrucción mecánica del líber y del cambium de Pinus resinosa Ait., así como la penetración del *Fomes annosus* en la albura de las raíces y del tronco induce la formación de pinosilvina y su éter monometílico en la parte afectada de la albura, mientras estas sustancias, típicas del duramen, no se encuentran en la albura sana. Además este autor ha conseguido su síntesis en el laboratorio en ramas desecadas lentamente, obteniendo una producción óptima a 25°C (von RUDLOFF y JORGENSEN⁽⁶⁴⁾, JORGENSEN y BALSILLIE⁽⁶⁵⁾). Parece posible que en su síntesis en la naturaleza puedan influir estos mismos factores.

LYR⁽⁶⁶⁾ en sus investigaciones sobre Pinus sylvestris subraya que la escasa resinación en los árboles heridos mecánicamente durante el invierno da lugar a una rápida desecación de los tejidos de la albura, por lo que la producción de pinosilvina es pequeña comparada con la de árboles heridos en el periodo de actividad vegetativa. Esto conduce a un mayor número de infecciones en los primeros.

Continuando en esta misma línea observa SHAIN⁽⁶⁷⁾ en Pinus taeda un fenómeno muy interesante. La inoculación de la albura de un árbol con el *Fomes annosus* da lugar a la aparición

de una zona impregnada de resina, y muy rica en fenoles, entre la albura sana y la infectada. Esta zona, denominada "reactions zone", zona de reacción, se encuentra también en árboles naturalmente infectados no sólo por el *Fomes annosus* sino también por otros hongos; se forma al avanzar el patógeno, y su parénquima está muerto y libre de almidón. Entre sus componentes fenólicos, ha identificado este autor pinosilvina, el éter monometílico de la pinosilvina, pinobanksina y pinocembrina, abundantes en el duramen sano, pero no detectables en la albura sana. Junto a ellos se encuentran presentes grandes cantidades de ácidos grasos, compuestos resinosos y componentes de carácter neutro.

Los extractos de esta zona inhiben el crecimiento longitudinal del micelio del *Fomes annosus* en ensayos llevados a cabo en sustrato de agar-malta y también la pudrición de probetas de madera. Además se ha comprobado que el hongo penetra mucho más lentamente en árboles en los que aparece esta zona de reacción que en aquellos que no la presentan. Según este autor, la pinosilvina y su éter monometílico pueden contribuir a esta resistencia pero no son los únicos responsables de ella; otros constituyentes de la zona, por ejemplo los ácidos grasos, presentes en gran cantidad, podrían tener también alguna participación.

El carácter inhibidor de algunos compuestos resinosos de *Pinus ponderosa* acumulados en heridas o puntos de infección de la albura ha sido objeto de estudios muy recientes (COBB et

al.⁽⁶⁸⁾. Este autor ha medido la toxicidad de resina cruda y de nueve componentes de la misma para *Fomes annosus* y cuatro hongos *Ceratocystis*, encontrando que el crecimiento del micelio era inhibido en todos los casos aunque había diferencias en la acción inhibidora individual de las sustancias.

También la albura de *Pinus contorta* Doug. var. *latifolia* Engelm. produce terpenos y otros compuestos como respuesta a la inoculación con el hongo *Euophium clavigerum*. Cuando la resina ción era intensa la resistencia se hacía efectiva (REID y SHRIMP⁽⁶⁹⁾ y SHRIMP⁽⁶⁹⁾ y WATSON⁽⁷⁰⁾).

2.3 Las sustancias fungitóxicas del abeto rojo

El abeto rojo (*Picea abies* Karst. o *Picea excelsa* Link) es la especie nativa de Europa más abundante en la parte norte del continente, sobre todo en los países escandinavos. En Alemania cubre un 36% de la superficie forestal. Económicamente presenta un gran interés, ya que tanto la madera como la corteza y las acículas son utilizadas ampliamente con diferentes fines ; sin embargo es conocido como poco resistente a la "pudrición del duramen", según se dijo anteriormente.

Los estudios químicos sobre esta especie, con vistas a aumentar su resistencia, no habían recibido hasta ahora tanta importancia como los del género *Pinus*. Existían investigaciones

sobre la constitución química de su líber, de la resina exudada por las heridas así como también de la madera, investigaciones que, sin embargo, no iban orientadas a buscar una relación con su resistencia a la pudrición; en los últimos años por el contrario se ha insistido precisamente en este aspecto. En los siguientes apartados se da una visión general de las sustancias fungitóxicas contenidas en los tejidos del abeto rojo o producidas en ellos por el ataque de los hongos.

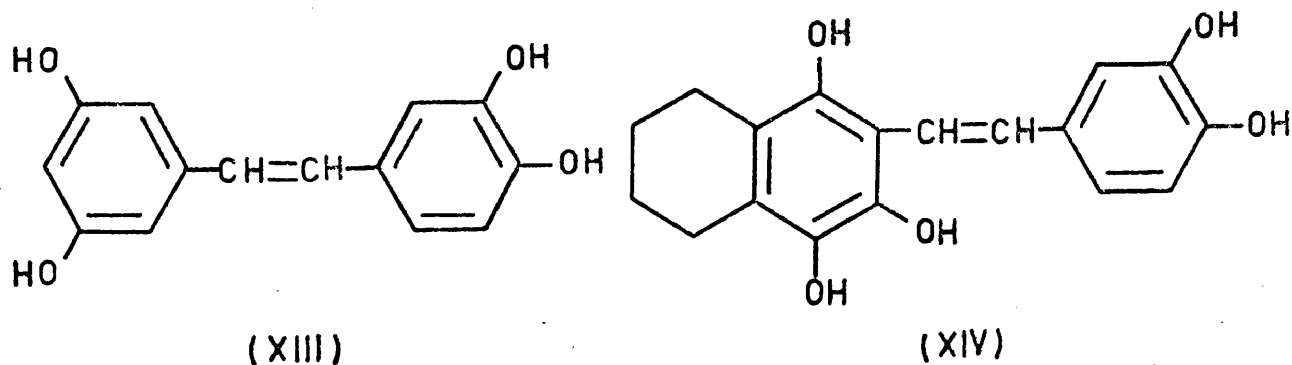
2.3.1 La acción inhibidora del líber frente al Fomes annosus. Toxicidad de algunos de sus componentes

La importancia del líber o corteza interna de los árboles, como posible barrera al ataque patógeno, no ha sido considerada hasta investigaciones muy recientes (LAATSCH et al.⁽⁷⁾, DIMITRI⁽¹⁹⁾, KUHLMAN⁽⁷¹⁾), aunque se había observado con anterioridad que era muy resistente y permanecía intacto después de la pudrición de la madera.

Los primeros indicios sobre la existencia de sustancias inhibidoras en la corteza de Picea abies se encuentran en NAIMIE⁽⁷²⁾ que mide la actividad biológica de un extracto etéreo del líber molido de diferentes árboles -entre ellos del abeto rojo- frente al Bacillus subtilis, encontrando que Picea abies y Fraxinus excelsior son las especies que presentan un mayor efecto inhibitor. JUNG⁽⁷³⁾ llega a la misma conclusión realizando

las experiencias con liber no sólo del tronco sino también de las raíces a lo largo del periodo de actividad vegetativa y utilizando como microorganismo de ensayo *Bacillus cereus*.

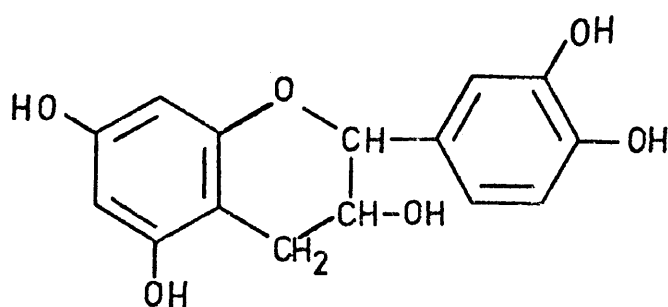
Pocos años antes GRASSMAN y ENDRES habían estudiado la corteza de *Picea abies* desde otro punto de vista, su contenido en taninos, ya que es una de las principales fuentes de taninos de Europa. Un resumen de sus trabajos en este campo ha sido publicado por ENDRES⁽⁷⁴⁾. Estos investigadores habían conseguido aislar entre otras una sustancia cristalina, derivada del estilbeno, a quien dieron el nombre de piceatanol. CUNNIGHAM et al.⁽⁷⁵⁾ aislaron nuevamente este compuesto asignándole una estructura mejor fundamentada (XIII) que la propuesta por GRASSMAN y ENDRES (XIV) y más de acuerdo con los datos experimentales. Sin embar-



go permanecía su carácter de estilbeno. Su constitución química es según los estudios de CUNNIGHAM semejante a la de la pinosilvina (VIa) y a la del oxiresveratrol (VII), ambos con propieda-

des fungitóxicas también en el piceatanol y probablemente en otros constituyentes de dicho líber.

Contemporáneamente (1956), FREUDENBERG⁽⁷⁶⁾ detecta la presencia en la corteza del abeto rojo de catequina (XV) y ta-



(XV)

xifolina (IV). De esta última ya hemos mencionado sus efectos fungitóxicos.

Para investigar la actividad inhibidora del líber de *Picea abies* y de sus constituyentes frente a *Fomes annosus* LAATSCH et al.⁽⁷⁾ realizan ensayos microbiológicos sobre agar-malta con líber molido y con diferentes extractos del mismo. Tanto el primero como los últimos inhiben el crecimiento del micelio de *Fomes annosus*, siendo la fracción polifenólica la que presenta el mayor poder inhibidor.

Para medir la fungitoxicidad de los componentes individuales del líber era preciso proceder a su aislamiento. La inse

guridad que presentaban las investigaciones de GRASSMAN y ENDRES hizo necesaria una revisión de los métodos y de los resultados por ellos obtenidos, especialmente en lo que se refiere a la identificación de los componentes, tarea realizada por ALCUBILLA⁽¹⁴⁾, en su Tesis Doctoral. ALCUBILLA⁽¹²⁾ da a conocer la existencia en el líber de *Picea abies* de los siguientes polifenoles:

Derivados del estilbeno:

- piceatanol (3,4,3',5'-tetrahidroxiestilbeno)
- glucósido del piceatanol
- isorapontigenina (3,5,4'-trihidroxi-3'-metoxiestilbeno)
- isorapontina (glucósido de isorapontigenina)
- resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno)
- piceído (glucósido del resveratrol)

Flavonoides:

- quercetina
- 3'-glucosil-quercetina
- taxifolina
- 3'-glucosil-taxifolina
- catequina

La acción inhibidora frente a *Fomes annosus* de algunas de estas sustancias ha sido medida en ensayos sobre agar-malta por WENZEL et al.⁽¹⁵⁾. Todos los compuestos ensayados hasta ahora se han mostrado inhibidores. Los valores ED-50 (concentración necesaria para inhibir el crecimiento del hongo en un 50%)

encontrados por este autor son los siguientes:

	<u>ED-50</u>
glucósido de piceatanol	~0,3 %
isorapontina	~0,4 %
taxifolina	~0,18 %

La quercetina y la catequina se muestran también como inhibidores, aunque en menor escala.

Junto a estos componentes fungitóxicos existen en el líber del abeto rojo azúcares, compuestos nitrogenados y otras sustancias que pueden influir favorablemente en el crecimiento del hongo y reducir la acción inhibidora de los primeros. Este aspecto será tomado en cuenta en los resultados propios.

2.3.2 La composición química de la resina y sus propiedades fungitóxicas

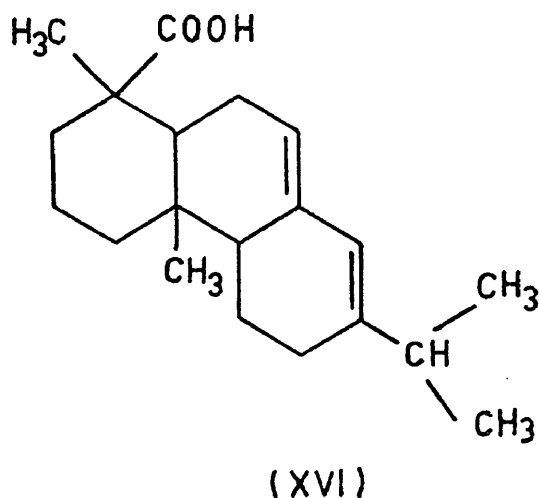
Con el nombre de "resinas" se suele designar un grupo muy complejo de sustancias, presentes en diferentes órganos de los árboles, insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos neutros, como éter de petróleo. Pueden incluir en su composición terpenos, compuestos ácidos, ésteres, alcoholes y además otros componentes neutros asociados con los anteriores.

Aunque el líber contiene también compuestos resinosos con carácter inhibidor (LAATSCH et al.⁽⁷⁾), aquí no nos vamos a referir a éstos, por presentarse en una proporción muy pequeña,

sino a la resina exudada por la madera como consecuencia de las heridas que le privan de la protección ofrecida por el líber.

La resina contenida en la madera de las coníferas puede ser de dos tipos principales: la presente en los canales resiníferos longitudinales -oleorresina- y la incluida en las células secretoras de los radios leñosos (MUTTON⁽⁷⁷⁾). En algunos géneros -Pinus, Picea, Larix y Pseudotsuga- los canales resiníferos pertenecen a la estructura normal de la madera. En otros, como Tsuga, Abies y Sequoia, generalmente están ausentes de ella, pero pueden ser producidos por heridas u otras causas.

La oleorresina es el líquido viscoso que fluye de la madera, cuando el árbol es herido, y por lo tanto presenta para nuestro estudio un especial interés. Consiste esencialmente en una solución de resina en un aceite volátil. Es sintetizada por las células resinógenas que forman las paredes de los canales resiníferos y está bajo la presión ejercida por estas células, la cual es la responsable de la exudación de la resina. Su composición es distinta de la de aquella resina contenida en las células secretoras de los radios leñosos. No se han podido hacer análisis directos de esta última, pero la comparación entre la composición de la oleorresina y la de la resina obtenida a partir de la madera por extracción indica que, mientras la primera contiene principalmente compuestos ácidos del tipo del ácido abiético (XVI), que designaremos como "áci-



dos resinosos" (*), la segunda se compone sobre todo de ácidos grasos.

KAHILA⁽⁷⁸⁾ encuentra en *Picea abies* valores de 69,7% de "ácidos resinosos" y 2,2% de ácidos grasos en la oleorresina, mientras un análisis total de la resina de la madera arroja 24% de ácidos resinosos y 45,5% de ácidos grasos.

La acumulación de resina en las heridas o puntos de infección de varias especies de coníferas, ha sido sugerida a menudo como un factor de resistencia a hongos patógenos. Por ejemplo RISBETH⁽⁷⁹⁾ subraya una exudación abundante de resina en las

(*) Con la expresión "ácidos resinosos" hemos designado lo que en inglés se conoce como "resin acids" y en alemán como "Harzsäuren". Son ácidos diterpénicos, de fórmula general $C_{20}H_{30}O_2$, típicos de la resina de las coníferas. En las frondosas, o no están presentes o sólo en muy pequeña cantidad.

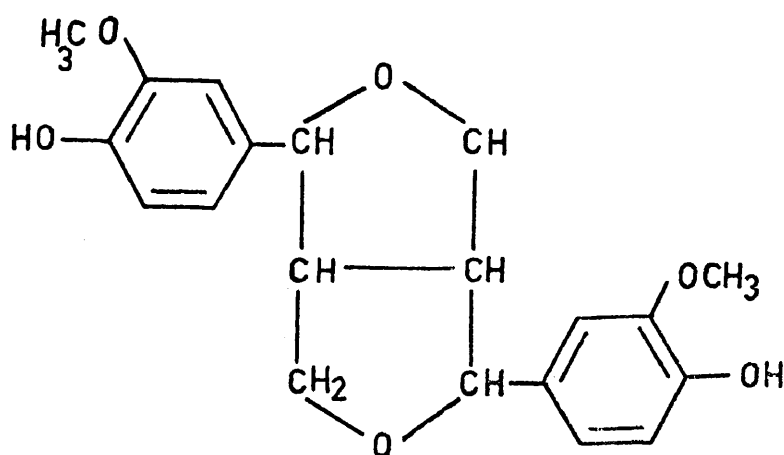
raíces de pinos infectados en suelos de carácter ácido, lo cual probablemente evita la invasión de los tejidos leñosos por el Fomes annosus.

El mecanismo de resistencia de la resina es presentado por algunos autores como simplemente mecánico, o sea la acumulación de resina daría lugar a una barrera o capa impermeable al agua, que no permitiría la vida a los hongos (VERRALL⁽⁸⁰⁾). Según otros, los componentes de la oleorresina ejercen un efecto inhibitor sobre el crecimiento del micelio de los hongos, y concretamente sobre el del Fomes annosus (COBB et al.⁽⁶⁸⁾).

SHAIN⁽⁸¹⁾ considera que ambos, el efecto fungitóxico y la protección mecánica, pueden jugar un papel importante en la resistencia. Este autor ha llevado a cabo ensayos biológicos con la resina cruda del abeto rojo y uno de sus componentes, el ácido abiético, frente al Fomes annosus, y encuentra que ambos inhiben el crecimiento lineal de su micelio. En nuestras investigaciones hemos llevado a cabo ensayos semejantes, estudiando además la variación de la producción de oleorresina en relación con diversos factores: humedad del suelo, estación del año, etc.

Aparte de estos dos tipos de resina existe otro que en alemán se conoce con el nombre de Überwallungsharz o resina de recubrimiento. Es la resina exudada por el árbol en forma de pequeñas gotas y muy lentamente entre el líber y la madera, como consecuencia de daños de diferentes tipos. Parece que está rela

cionada con el proceso de "curación" de la herida, y su composición es muy distinta de la que presentan las dos anteriores. En la resina de recubrimiento de *Picea abies* se han encontrado lignanos, entre ellos, pinoresinol (XVII) (HILLIS⁽⁸²⁾).



(XVII)

Sobre las propiedades tóxicas de esta resina no se han realizado todavía ningunos estudios. Pinoresinol se ha mostrado tóxico frente a *Lentinus lepideus* (RUDMAN⁽³⁸⁾).

2.3.3 La madera del abeto rojo y su respuesta a la infección del *Fomes annosus*

Los estudios químicos sobre la madera del abeto rojo se deben sobre todo a FREUDENBERG y sus colaboradores.

FREUDENBERG y KNOF⁽⁸³⁾ investigan el extracto de aceto-

na-agua del duramen molido, encontrando junto a un 0,5% de sustancias no fenólicas y un 0,5% de sustancias tipo lignina , un 0,6% de lignanos. Entre ellos identificaron estos autores (-) matairesinol, del que ya hemos hablado, un lignano aislado por primera vez del duramen de *Podocarpus spicatus* (llamado comúnmente "matai"), que tiene propiedades tóxicas frente a algunos hongos, como ya se ha visto anteriormente. Es posible que otros componentes presenten también este carácter tóxico, pero parece ser que el efecto inhibidor total de estas sustancias es insuficiente para resistir a la pudrición.

La albura de estos árboles, sin embargo, es mucho más resistente. SHAIN⁽⁸¹⁾ observa la existencia en algunos abetos rojos atacados por la pudrición del duramen de una zona verde-oliva entre la albura sana y la madera enferma, que denomina, igual que en los pinos (2.2.2), "zona de reacción". La misma zona aparece en árboles infectados artificialmente con *Fomes annosus*. Entre sus constituyentes ha encontrado este autor sustancias fenólicas, al parecer lignanos (SHAIN⁽⁸⁴⁾) que pueden ser en su opinión responsables de su resistencia. Nuestros propios trabajos confirman también esta suposición.

2.4 Relaciones entre los factores ecológicos del hábitat forestal, el estado de nutrición del abeto rojo y la "pudrición del duramen"

Como ya se dijo en la introducción, la pudrición del duramen del abeto rojo se presenta con mayor frecuencia en hábitats forestales de unas características ecológicas determinadas. En la bibliografía sobre el tema se encuentran datos abundantes con relación a este hecho. Así, ROHMEDER⁽⁸⁵⁾ hizo ya en 1937 un estudio detallado de la dependencia entre la pudrición del duramen y el medio ambiente. Investigaciones más recientes han venido a confirmar estas observaciones. DIMITRI⁽⁸⁶⁾ encuentra que la germinación de las esporas de *Fomes annosus* sobre los tocones procedentes de la tala de los árboles, varía con los tipos de suelo y es particularmente intensa en aquéllos ricos en carbonatos. Asimismo, WERNER⁽⁸⁷⁾ y ZYCHA y KATO⁽⁸⁸⁾ muestran que el tanto por ciento de los árboles enfermos de pudrición guarda estrecha correlación con determinados factores ecológicos del medio.

Para explicar esta dependencia entre el complejo ambiental y la pudrición del duramen, se han señalado varias causas, que, sin embargo, no la aclaran por completo. Unas de estas causas se refieren al hongo -ausencia de antagonistas en determinados tipos de suelo, falta de elementos nutritivos-, otras atañen al árbol -predisposición a la enfermedad a causa de la for-

mación de grietas en la corteza de las raíces, etc.

LAATSCH basándose en las consideraciones anteriores, en observaciones personales y en datos de laboratorio, formuló la hipótesis de trabajo que ya enunciamos textualmente en la introducción, y en la cual, admitiendo las causas enunciadas más arriba como posibles, busca además explicar la predisposición de la planta como consecuencia de una concentración insuficiente de sustancias inhibidoras en el líber de las raíces. Estas sustancias, en su mayoría de carácter fenólico como ya se sabía por investigaciones anteriores, se forman a partir de los productos primarios de la fotosíntesis -según ha comprobado DITTRICH (17) mediante experimentos llevados a cabo con C^{14} -, la cual a su vez depende del abastecimiento de la planta con agua y elementos nutritivos. Un estado de nutrición deficiente o no armónico debería disminuir por tanto la síntesis de compuestos inhibidores y con ello la resistencia del líber a la penetración del parásito.

Con ayuda de esta hipótesis se puede explicar el hecho de que la "pudrición del duramen" se presente con mayor frecuencia en los siguientes hábitats forestales:

- aquéllos en que el suelo experimenta sequías periódicas y las raíces se encuentran muy superficiales
- los que poseen un suelo con un alto contenido en carbonatos, o atravesado periódicamente por corrientes de agua bi

carbonatada

- los que presentan un suelo muy rico en nitrógeno.

Estos factores ejercen un gran influjo en el estado de nutrición de los árboles -como veremos en los apartados siguientes-, y éste, a su vez, sobre las propiedades fungitóxicas del líber del abeto rojo, según demuestran los resultados de la presente investigación. La consideración de las relaciones entre los factores ecológicos, el estado de nutrición del árbol y su resistencia a la infección, proporciona una nueva interpretación a la dependencia existente entre complejo ambiental y "putridión del duramen", y abre caminos inéditos a la lucha contra esta enfermedad, por ejemplo, por medio de un abonado conveniente.

2.4.1 Influencia de las sequías periódicas del suelo

Cuando aquella zona del suelo en la que se encuentran la mayoría de las raíces de los árboles está sometida periódicamente a fuertes sequías, se produce una reducción de la actividad fotosintética y con ello del transporte de azúcar en la planta (KRAMER⁽⁸⁹⁾). Según este autor, en estos periodos las acículas sufren falta de agua y por tanto se ven obligadas a cerrar los estomas demasiado pronto durante el día, limitando la transpiración. La carencia de agua dificulta además la absorción de potasio por las raíces, lo cual conduce igualmente a una inhibi

ción de la fotosíntesis (VAADIA et al.⁽⁹⁰⁾). Los tejidos vivos del tronco y de las raíces no reciben de esta forma suficiente cantidad de elementos nutritivos y quedan inhabilitados para una síntesis normal de productos secundarios, entre ellos, como se verá en los propios resultados, de sustancias inhibidoras. Además, las raíces se agrietan por esta falta de agua, abriendo la puerta al ataque de los hongos.

Los trabajos de varios autores vienen a confirmar estas afirmaciones. Entre ellos REHFUESS⁽¹⁰⁾ ha encontrado una correlación negativa entre el porcentaje de árboles enfermos de pudrición y el abastecimiento de agua del suelo.

Si a esta seguía se une la existencia de una red de raíces muy superficial, el peligro de infección es mucho mayor, no sólo por la falta de agua, sino también por la posibilidad de contactos entre raíces de árboles vecinos, pudiendo pasar el parásito de un árbol infectado a uno sano. Esta forma de propagación de la enfermedad es muy importante en el caso del *Fomes annosus*, ya que este hongo, debido a sus antagonistas, no puede crecer en el suelo sino sólo sobre la madera (SCHÖNHAR⁽⁶⁾).

2.4.2 Influencia de un suelo con un alto contenido en carbonatos

Un suelo muy rico en carbonatos dificulta el abastecimiento del abeto rojo con potasio, manganeso y hierro. ZECH⁽⁹¹⁾

ha estudiado detenidamente este fenómeno en suelos calizos del sur de Alemania, encontrando que, incluso para altas concentraciones de potasio en el suelo, el abastecimiento de la planta con este elemento puede ser deficiente, a causa del conocido antagonismo potasio-calcio. En algunos casos, la deficiencia en potasio puede ser tan grande que aparezca la clorosis de las acículas tornándose las puntas amarillas.

Más frecuente aún se presenta en estos tipos de suelo la deficiencia en manganeso del abeto rojo (ZECH⁽⁹²⁾, KREUTZER⁽⁹³⁾). Las acículas más jóvenes se vuelven totalmente amarillas, sobre todo las que están situadas más cerca del tronco, las antiguas permanecen verdes aunque a veces palidecen un poco. Esta insuficiente nutrición con manganeso puede ocasionar además una inactivación del hierro, de forma que aunque las acículas posean una concentración alta en este elemento, sólo una pequeña parte de ella es activa fisiológicamente. Este fenómeno ha sido designado como deficiencia relativa de hierro (ZECH⁽⁹²⁾). El alto pH del suelo puede causar además una deficiencia absoluta de este elemento. En este caso, las acículas nuevas de los árboles jóvenes presentan un color blanco amarillento.

El elevado pH del suelo es también la causa de la deficiencia de manganeso, ya que los árboles sólo pueden asimilar este elemento si se encuentra en forma Mn^{++} , y para la reducción del Mn^{3+} y Mn^{4+} se requiere un pH más bajo que el de estos sue-

los. Aunque las raíces o las mycorrizas puedan bajar el pH de las regiones inmediatas mediante secreciones ácidas, facilitando la absorción de manganeso y hierro, esto tendrá solo un efecto momentáneo en el caso de que el suelo esté atravesado por corrientes de agua bicarbonatada.

La deficiencia de potasio reduce, como ya dijimos antes, la actividad fotosintética de la planta, a través de una disminución de la presión de turgescencia. Esto a su vez hace que la corteza de las raíces presente grietas, lo que facilita el ataque de los hongos. Igualmente la deficiencia en manganeso y hierro dificulta la fotosíntesis (KREUTZER⁽⁹⁴⁾).

REHFUESS^(9,10) al examinar las relaciones entre contenido en carbonatos -o bien el pH del suelo-, el estado de nutrición del abeto rojo y el tanto por ciento de árboles enfermos de pudrición en el Schwäbische Alb (Baden - Württemberg) encuentra que los bosques más dañados son aquellos de suelos calizos, donde los árboles presentan una nutrición deficiente en manganeso y hierro, junto con falta de nitrógeno. Las investigaciones llevadas a cabo por SCHÖNHAR⁽³⁾ sobre los hongos causantes de la pudrición del abeto rojo en esta misma región, conducen asimismo a la conclusión de que el ataque del *Fomes annosus* es mucho más frecuente en suelos calizos con un pH elevado que en sue-los de carácter ácido.

2.4.3 Influencia de un suelo muy rico en nitrógeno

Los hábitats forestales que presentan suelos muy ricos en nitrógeno, como son aquellos utilizados anteriormente con fines agrícolas, o bien, los que por naturaleza poseen una alta concentración en este elemento, se ven especialmente afectados por la pudrición del duramen (ROHMEDER⁽⁸⁵⁾).

El hecho de que el nitrógeno sea uno de los elementos que favorecen el ataque de los hongos al encontrarse en concentraciones excesivamente altas es ya conocido en otras plantas (KRAUSS⁽⁹⁵⁾). Las causas que se han dado para explicarlo han sido varias. Por una parte, el gran contenido de los tejidos en compuestos nitrogenados ofrecería al hongo un buen sustrato nutritivo (KLEIN⁽⁹⁶⁾). Además, un abonado exclusivamente a base de nitrógeno ha dado lugar en algunos casos a una concentración de fenoles más pequeña, lo cual es origen de una menor resistencía a la infección de los hongos, como se ha observado en el trigo (PLANK⁽⁹⁷⁾). Grandes cantidades de nitrógeno impiden también una lignificación completa, debido a lo cual los tejidos presentan escasa resistencia a la penetración del parásito. En el apartado 4.1.3.4 será expuesto cuáles de estas causas juegan en el abeto rojo, según nuestras investigaciones, un papel importante.

Contemplado el problema desde este punto de vista, sería por tanto preferible una deficiencia de nitrógeno a un exceu

so de este elemento. Sin embargo, cuando la deficiencia es demasiado grande puede reducir la actividad fotosintética de la planta y con ello su resistencia. En cada caso será necesario estudiar las condiciones óptimas del abonado.

3. Material y métodos

3.1 Análisis del líber. Extracción y determinación de su contenido en sustancias inhibidoras y estimulantes del crecimiento del Fomes annosus

3.1.1 Procedencia del material. Toma y preparación de las muestras

El líber utilizado en estas investigaciones procede de diversas plantaciones de abetos rojos situados en el sur de Alemania. Como se intentaba examinar la composición química de los extractos y el efecto inhibidor de dicho líber bajo distintas condiciones ecológicas, en cada experimento se han escogido precisamente aquellos hábitats forestales que presentaban las características requeridas, las cuales se detallarán, para mayor claridad, al principio de cada nueva experiencia dentro del capítulo de los resultados, junto con los datos referentes a la edad de los árboles, altura de los mismos, fecha de la toma de muestras, etc. En cada caso se especificará también si se ha trabajado con líber del tronco o de las raíces. Sólo en circunstancias excepcionales, a las que se alude en el texto, el material proviene de árboles talados. Las muestras han sido tomadas en todos los casos entre las 9 y las 11 de la mañana.

Para la toma de muestras se ha seguido el siguiente procedimiento. Con un taladrador de corchos, de 1,5 cm de diámetro, desinfectado con metanol, se perfora la corteza hasta llegar a

la albura. Los discos resultantes se desprenden de esta última con ayuda de un escalpelo, y con este mismo instrumento se separa cuidadosamente la corteza externa, introduciendo inmediatamente el resto -líber o corteza interna- en vasos Dewar con hielo seco (-80°C) (KERN⁽⁹⁸⁾) para evitar la oxidación enzimática de los polifenoles, que en condiciones normales, en presencia de aire, se efectúa con gran rapidez. A continuación se desinfecta la herida sufrida por el árbol con metanol y se cubre con cera vegetal para evitar infecciones. Ya en el laboratorio, el líber congelado se muele en un turmix con hielo seco pulverizado, lo que además de impedir la oxidación permite una trituration más perfecta. Las muestras ya molidas se introducen en matraces de fondo redondo con atmósfera inerte, haciendo circular a través de ellas una corriente de CO_2 que arrastra trazas de SO_2 al atravesar un frasco lavador con NaHSO_3 húmedo. El SO_2 tiene el fin de envenenar los enzimas oxidativos. Mientras esté circulando la corriente -aproximadamente el tiempo necesario para el descongelamiento de las muestras- es conveniente agitar con frecuencia el contenido de los matraces para que el efecto del anhídrido sulfuroso llegue a todas las partículas. Este proceso del envenenamiento de los enzimas es decisivo si se quiere realizar una determinación cuantitativa de los fenoles. Al final debe poseer el líber su color original, blanco. Las muestras se conservan hasta su utilización en esos mismos matraces, dentro

de una cámara frigorífica a -18°C .

La determinación del tanto por ciento de sustancia seca del líber se efectúa secando muestras de 1 g a 105°C hasta peso constante.

3.1.2 Preparación de los extractos

Las muestras molidas son sometidas a sucesivas extracciones con el fin de obtener grupos de sustancias con propiedades afines. El proceso de extracción que se ha seguido presenta algunas variaciones respecto al descrito por LAATSCH et al.⁽⁷⁾ para el líber del abeto rojo, acomodadas al fin de nuestro trabajo.

3.1.2.1 Extracción con cloroformo

Para separar las sustancias resinosas se ha realizado una primera extracción con cloroformo (GRASSMAN et al.⁽⁹⁹⁾), según el siguiente método:

6 g de una muestra de líber molido se calientan a refluxo con 30 ml de cloroformo a la temperatura de $60-70^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora, en un aparato eléctrico que permite extraer simultáneamente seis muestras. Al cabo de este tiempo se deja enfriar, y se separa por filtración a través de lana de vidrio la solución de cloroformo, de color amarillo-verdoso. Se repite la extracción cuatro veces más en las mismas condiciones.

Los extractos de cada muestra se reúnen y se evaporan a presión reducida. El residuo es una masa oleosa de un color amarillo claro u oscuro, según la cantidad, y con olor de resina. Se determina su concentración en el líber por pesada.

Durante esta extracción y la siguiente se hace circular a través del dispositivo una corriente lenta de CO_2 con trazas de SO_2 . También se hace pasar una corriente de estos gases a través de todos los disolventes que se van a utilizar.

3.1.2.2 Extracción con etanol-agua (1:1)

El líber procedente de la extracción con cloroformo se libera de los restos de éste haciendo circular a través de él una corriente fuerte de CO_2 con SO_2 y manteniendo la temperatura entre $60-70^\circ\text{C}$. A continuación se somete a una extracción con etanol-agua (1:1), según ENDRES⁽¹⁰⁰⁾, utilizando el mismo dispositivo que en la extracción anterior y las mismas condiciones, pero a una temperatura menor, entre 50 y 60°C . Se realizan igualmente cinco extracciones, cada una de 1 hora de duración, al cabo de las cuales han sido extraídas prácticamente todas las sustancias interesantes en nuestro caso. Los extractos correspondientes a cada muestra se reúnen en un matraz aforado de 250 ml, que se enrasa con etanol-agua (1:1). Esta solución, que contiene una mezcla de polifenoles, azúcares y otros compuestos, será utilizada como base en las investigaciones siguientes.

Operando de la forma anterior se obtiene un peso de extracto de etanol-agua no superior a 1 g. Cuando se requieren cantidades mayores, por ejemplo, para hacer ensayos frente a los hongos, se debe partir de un peso superior de líber molido, pero utilizando las mismas proporciones de disolvente para que la extracción sea completa. Los extractos se evaporan a sequedad, a presión reducida, en un Rotavapor, manteniendo la temperatura del baño de agua por debajo de los 40°C. El residuo pierde con dificultad los últimos restos de agua, lo que origina su oxidación al ponerse en contacto con el aire. Para evitarlo se redissuelve en metanol y se vuelve a evaporar. El extracto presenta un color ocre claro y aspecto espumoso, apareciendo completamente seco. En estas condiciones es difícil la oxidación de los fenoles.

3.1.2.3 Reparto del extracto de etanol-agua en el sistema éter/agua

10 ml de extracto de etanol-agua se evaporan a sequedad a presión reducida, en el Rotavapor, disolviendo el residuo en 10 ml de agua. Esta solución se extrae cinco veces, con 20 ml de éter cada una, en un embudo de separación. Las fases etéreas se reúnen en un matraz y se depositan durante 1 hora en una cámara frigorífica a -18°C hasta que se congela el agua que arrastran. Al cabo de este tiempo se filtran y se colecta el líquido en un

matraz aforado de 100 ml enrasándolo y reservando la solución para la determinación cuantitativa de los fenoles en ella contenidos. Como ya se especificará más tarde (4.1.1.1) se trata principalmente de polifenoles libres. El agua congelada se une a la fase acuosa que contiene glucósidos, catequina y otras sustancias afines, azúcares, aminoácidos y otros compuestos; se utiliza para la determinación cuantitativa de los mismos.

3.1.3 Examen cromatográfico de los extractos

El extracto de etanol-agua de las distintas muestras de líber, así como en algunas ocasiones la fase etérea y la fase acuosa del mismo procedentes de su reparto en el sistema éter/agua han sido examinados cromatográficamente mediante cromatografías sobre papel y capa fina.

3.1.3.1 Cromatografía sobre papel

Como papel cromatográfico se ha utilizado Schleicher & Schüll n^o 2043 b (29 x 30 cm), en técnica ascendente bidimensional, empleando los siguientes disolventes de desarrollo:

I butanol - ácido acético - agua (4:1:5)

II ácido acético 6%

III etanol-agua (1:3)

El desarrollo de los cromatogramas se realiza en la oscuridad, en una cámara cromatográfica para papel, saturada pre-

viamente durante 24 horas con los vapores del disolvente de desarrollo, y a una temperatura de 22°C.

Para caracterizar las sustancias se observan los cromatogramas a la luz ultravioleta (366 nm) y se emplean los siguientes reveladores:

Cloruro de aluminio (CRAMER⁽¹⁰¹⁾). Solución de AlCl_3 al 1% en alcohol etílico. Una vez pulverizado el cromatograma se somete a la acción de la luz ultravioleta.

Vanillina-HCl (reactivo de Lindt) (WATKIN et al.⁽¹⁰²⁾) Se disuelve 1 g de vanillina en 12 ml de metanol y a esta solución se le añaden 6 ml de HCl al 25%. Este reactivo se puede conservar en la cámara frigorífica algunos días.

3.1.3.2 Cromatografía de capa fina

Los extractos se examinan también por cromatografía de capa fina sobre poliamida y celulosa en técnica bidimensional, utilizando las placas "Selecta (Schleicher & Schüll) de 20x20 cm, poliamida G 1600 y celulosa G 1440.

Como disolventes de desarrollo se utilizan P I y P II para placas de poliamida y C I y C II para placas de celulosa (Tabla II, pág. 68).

Los cromatogramas se desarrollan en la oscuridad en cámaras Desaga de separación simultánea, previamente saturadas durante 30 minutos con los vapores del disolvente de desarrollo em

pleado y a una temperatura de 22°C.

La posición de las sustancias se determina observando los cromatogramas a la luz ultravioleta (366 nm) y utilizando los mismos reveladores que en la cromatografía sobre papel (3.1.3.1).

3.1.4 Análisis cuantitativo de los constituyentes fenólicos

La determinación cuantitativa de los fenoles contenidos en la fase etérea y en la fase acuosa del extracto de etanol-agua, de donde proviene la mayor parte del carácter inhibitor del líber, se lleva a cabo por métodos colorimétricos, como se describe a continuación.

3.1.41.1 Determinación cuantitativa de los polifenoles en la fase etérea

La fase etérea del extracto de etanol-agua contiene polifenoles libres -entre ellos, los aglucones de los glucósidos que se encuentran en la fase acuosa-, como se verá en el apartado 4.1.1.1 de los resultados.

La determinación cuantitativa del contenido total en fenoles de esta fase se ha realizado con el reactivo de Folin-Ciocalteu -preparado según propone la A.O.A.C. (HORWITZ⁽¹⁰³⁾)- y siguiendo el método expuesto más adelante.

Reactivo de Folin-Ciocalteu

Se disuelven 100 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 25 g de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 700 ml de agua en un matraz de fondo redondo de 2 l. Se añaden 50 ml de ácido fosfórico concentrado y 100 ml de HCl del 36%, calentando la mezcla suavemente a reflujo durante 10 horas. Pasado este tiempo y enfriada la solución se agregan 150 g de sulfato de litio, 50 ml de agua y 4-6 gotas de bromo. Se hace hervir la mezcla 15 minutos para expulsar el exceso de bromo y luego se deja enfriar. Se pasa después a un matraz aforado de 1 litro y se enrasa con agua. El reactivo presenta un color amarillo-oro. Se debe conservar en un frigorífico.

Antes de su utilización se diluye un volumen de esta solución con dos volúmenes de agua.

Método

A 10 ml de la fase etérea se le añaden 20 ml de etanol. Se hace evaporar el éter a presión reducida en un Rotavapor y el resto de la solución se enrasa nuevamente con etanol a 20 ml. De esta solución se toman partes alícuotas de 0,5 ml, se diluyen con 5 ml de agua y se añaden 1,5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu. Se mezcla bien. Se adiciona 1 ml de carbonato sódico en agua al 14%, se vuelve a agitar fuertemente y se mantiene en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos (el color pasa de verde a azul). Una vez frías, las pruebas se centrifugan por es

pacio de 5 minutos al cabo de los cuales se mide la absorbancia a 760 m μ ; estas lecturas han sido realizadas en un espectrofotómetro Zeiss con cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor, frente a una prueba en blanco preparada con etanol absoluto y los reactivos. Esta prueba es incolora.

Para la curva de calibrado se ha utilizado sustancia seca de la fase etérea del líber del abeto rojo.

3.1.4.2 Determinación cuantitativa de los polifenoles en la fase acuosa

La fase acuosa contiene junto a compuestos fenólicos -fundamentalmente glucósidos y catequinas-, azúcares, aminoácidos y otras sustancias. Los fenoles se pueden determinar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, según se expone a continuación en el apartado a), ya que los otros componentes de esta fase, (apartado b), no ejercen en este caso influencia alguna en el color de la reacción, como se verá en el capítulo 4.1.1.3 de los resultados.

a) Para determinar cuantitativamente los glucósidos, y las catequinas y las leucoantocianinas de la fase acuosa se sigue el siguiente procedimiento:

Un determinado volumen de la fase acuosa se diluye con 19 volúmenes de etanol-agua (1:1). Con partes alícuotas de esta solución, "solución base", de 0,5 ml se lleva a cabo la reac -

ción con el reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo el método ex puesto para los polifenoles libres. De esta forma se obtiene una absorbancia global T.

La concentración del grupo de las catequinas y las leucoantocianinas se puede determinar con el reactivo de Lindt, -preparado de igual forma que en 3.1.3-, siguiendo el siguiente método:

A 0,5 ml de la solución base se le añaden 3,5 ml de HCl del 25% y 1 ml del reactivo de Lindt. A continuación se agita fuertemente apareciendo un color rosa. Exactamente a los 5 minutos se mide la absorbancia a 500 m μ utilizando cubetas de 1 cm de espesor. Para la prueba en blanco se utiliza etanol-agua (1:1). La curva de calibrado se ha preparado con (+) catequina (de la casa Roth, Karlsruhe) como sustancia de referencia. De ella se puede deducir la concentración de catequinas y leucoantocianinas, c.

A partir de una segunda curva de calibrado, correspondiente a la reacción de (+) catequina con el reactivo de Folin-Ciocalteu, se puede deducir la absorbancia (absorbancia C) que correspondería a la concentración de catequinas y leucoantocianinas encontrada anteriormente (c), si se utilizara el reactivo de Folin-Ciocalteu en lugar del Lindt, y que es la absorbancia con que contribuyen las catequinas al valor global T.

Restando de esta absorbancia global T la absorbancia C

de las catequinas y leucoantocianinas, se obtiene la absorban -
cia G correspondiente a los glucósidos. La concentración de es-
tos ha sido obtenida de una curva de calibrado construida con ra
pontina (Roth, Karlsruhe) como sustancia de referencia y el re-
activo de Folin-Ciocalteu.

b) Con el fin de estudiar la influencia de los componen-
tes no fenólicos en la determinación cuantitativa de fenoles
por los métodos anteriores, se ha procedido a la separación de
ambos grupos de sustancias por medio del siguiente experimento:

Una columna cromatográfica de 20 cm de altura y 3 cm de
diámetro se rellena con una suspensión de 40 g de polvo de po-
liamida (Poliamida 11 para capa fina Merck) en agua. La columna
se lava con el mismo disolvente durante 24 horas. Se aplican
300 mg de un extracto seco de la fase acuosa disueltos en 1 ml
de agua y se eluye la columna con este mismo disolvente a una
velocidad de 2 ml por hora. El eluado se recoge en fracciones
de 2 ml y se suspende la elución cuando aparecen los primeros
fenoles (observando una gota de la solución sobre papel cromato
gráfico a la luz ultravioleta). Las fracciones anteriores, que
contienen fundamentalmente azúcares y algunos aminoácidos se re
únen y se evaporan a sequedad, a presión reducida.

Con el residuo se lleva a cabo la reacción de Folin-Cio-
calteu. También se han verificado con él ensayos biológicos.

3.1.5 Determinación cuantitativa de azúcares

El contenido total en azúcares de la fase acuosa del extracto de etanol-agua o bien directamente del mismo, se ha llevado a cabo colorimétricamente con antrona.

Preparación de la solución de azúcares

2 ml del extracto de etanol-agua (3.1.2.2) o de su fase acuosa (3.1.2.3) se diluyen con 20 ml de agua y a la solución se adicionan 200 mg de carbón activo, con el fin de absorber los fenoles que hay en la misma, agitando la suspensión durante 10 minutos. Se centrifuga 5 minutos y se decanta el líquido sobrenadante filtrándolo a través de un embudo con placa de vidrio poroso, recogiendo el líquido en un matraz aforado de 50 ml. Se repite la operación añadiendo al residuo de carbón activo 20 ml de agua, centrifugando y filtrando el líquido sobrenadante como la vez anterior. La solución debe ser totalmente incolora. Por último, se enrasa el matraz con agua a 50 ml.

Reactivo de antrona (MORRIS⁽¹⁰⁴⁾)

2 g de antrona se disuelven en 1 litro de ácido sulfúrico del 95% (preparado adicionando 1 litro de ácido sulfúrico concentrado a 50 ml de agua y enfriando la solución).

Método

Se ha seguido el método de EBELL⁽¹⁰⁵⁾ modificado en par

te por nosotros.

A 2 ml de la solución a investigar, preparada como se describe más arriba, o de agua si se trata de la prueba en blanco, se añaden en un baño de hielo 6 ml del reactivo de antrona, se agita fuertemente y se mantiene la mezcla por espacio de 5 minutos en el baño frío. A continuación se calienta durante 7,5 minutos en un baño de agua hirviendo. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se mide su absorbancia a 620 m μ . La concentración de azúcar se calcula como glucosa a partir de una curva de calibrado (preparada con D-glucosa anhidra), que debe ser repetida para cada determinación.

3.1.6 Determinación cuantitativa de almidón

El almidón ha sido determinado en el residuo de líber procedente de la extracción con etanol-agua según el método de McCREADY et al.⁽¹⁰⁶⁾, como a continuación se describe:

Extracción del almidón

A 200 mg de residuo del líber seco (que debe estar libre de hidratos de carbono extraíbles con etanol-agua (1:1), se añaden 5 ml de agua fría, y a continuación, agitando sin cesar, 6,5 ml de ácido perclórico del 52% (preparado disolviendo 270 ml de ácido perclórico del 72% en 100 ml de agua). Con una varilla de vidrio se revuelve la mezcla continuamente durante los 5 pri

meros minutos y de vez en cuando los 15 minutos siguientes. Al cabo de este tiempo se adicionan 20 ml de agua y se centrifuga. A continuación se filtra, recogiendo el líquido en un matraz aforado de 100 ml; al residuo procedente de la centrifugación se le añaden nuevamente 5 ml de agua y 6,5 ml de ácido perclórico del 52%. Se revuelve esta suspensión alguna vez durante un periodo de 30 minutos. Se centrifuga y se filtra en el matraz aforado que contiene el primer extracto, llevando su contenido a 100 ml con agua.

Determinación

5 ml de esta solución se diluyen a 500 ml y a continuación se sigue el método descrito por los azúcares en el apartado anterior. La concentración de glucosa encontrada hay que multiplicarla por 0,9 para convertirla en almidón.

3.1.7 Determinación del contenido en nitrógeno

3.1.7.1 Determinación del nitrógeno total

En aquellos experimentos en los que se ha estudiado el efecto del abastecimiento del árbol con nitrógeno sobre la acción inhibidora de su líber, han sido realizadas determinaciones de la concentración de este elemento no sólo en las acículas, sino también en el líber.

Los análisis de nitrógeno total en el líber molido y en el extracto de etanol-agua del mismo, han sido llevados a cabo según el método de Kjeldahl, siguiendo el procedimiento que se describe en 3.5.6 para el análisis de acículas.

En el caso del líber se ha trabajado con cantidades de 100-200 mg de sustancia secada con anterioridad a 80°C y tamizada a través de un cedazo de 1 mm. Para los análisis de nitrógeno en el extracto de etanol-agua, se ha partido de 10 ml de solución.

3.1.7.2 Análisis de aminoácidos

Los aminoácidos libres contenidos en el extracto de etanol-agua, o bien en su fase acuosa, se han determinado con un analizador automático de aminoácidos UNICHROM (de la casa Beckman) equipado con resinas cambiadoras esféricas de la serie M--Beckman (*).

La identidad de los aminoácidos encontrados se ha comprobado también por cromatografía de placa fina sobre celulosa y gel de sílice. Para la cromatografía sobre celulosa se han utilizado placas "Selecta" (Schleicher & Schüll) de 20 x 20 cm, ce

(*) Estos análisis han sido realizados en el Max-Planck Institut für Biochemie de Munich, por lo que expresamos nuestro agradecimiento al Prof. Dr. G. Braunitzer y al personal del Laboratorio de Análisis de aminoácidos.

lulosa G 1440, empleándose los disolventes de desarrollo C III y C IV (Tabla II, pág. 68).

En el caso de la cromatografía sobre gel de sílice con yeso, se han empleado placas de 0,25 mm de espesor, preparadas extendiendo una suspensión de 30 g de silicagel G (Merck) en 60 ml de agua con el aplicador Desaga sobre cinco cromatoplasas de 20 x 20 cm y dejándolas secar al aire durante una noche. Como disolventes de desarrollo se han utilizado Sg I y Sg II (Tabla II, pág. 68).

Para determinar la posición de las sustancias se ha usado como revelador, tanto para placas de celulosa como para las de silicagel, una disolución alcohólica de ninhidrina, obtenida disolviendo 0,3 g de ninhidrina en 100 ml de 1-butanol y 3 ml de ácido acético. El cromatograma se calienta a continuación a 110°C durante un cuarto de hora.

3.1.7.3 Hidrólisis de péptidos

El extracto de etanol-agua contiene, además de aminoácidos libres, péptidos cuya hidrólisis se ha llevado a cabo según el siguiente procedimiento:

5 ml del extracto de etanol-agua (1:1) se evaporan a sequedad en un Rotavapor. El residuo se disuelve en 1-1,5 ml de HCl 6N y se introduce en un tubo de ensayo con un estrechamiento capilar, con ayuda de un baño de hielo seco y acetona. Una

vez realizada esta operación, se hace el vacío con una bomba de agua y se cierra el tubo a la llama por el capilar. Se mantiene a continuación 22 horas a una temperatura de 110°C . Los aminoácidos procedentes de la hidrólisis han sido analizados como en 3.1.7.2.

3.2 Ensayos con la resina

3.2.1 Toma y preparación de las muestras

Para la toma de muestras de resina se ha seguido el siguiente procedimiento, adaptado del de GIBBS⁽¹⁰⁷⁾:

Con el taladrador utilizado para la toma de muestras de líber ($\phi = 1,5$ cm) se perfora la corteza del árbol hasta llegar a la albura y se separa el disco resultante con ayuda del escalpelo. En la herida producida, que hemos llamado "herida patrón", se sujeta un extremo de un tubo de cristal, de igual diámetro que la herida, doblado en ángulo recto, cuyo otro extremo termina en un capilar unido a un tubo colector mediante un tapón. Se toman muestras con una distancia de tres semanas. La resina colectada se pesa y se disuelve en acetona. Si se deja evaporar el disolvente, se obtiene una masa blanca cristalina cubierta por una capa oleosa de color amarillo.

Las particularidades acerca del lugar, fecha, etc. de la toma de muestras de resina serán detalladas como en el caso del

líber, al principio de cada experimento dentro del capítulo de los resultados.

3.2.2 Examen cromatográfico

La masa blanca cristalina, de la que hemos hablado anteriormente (3.2.1) se examina por cromatografía de placa fina utilizando placas de silicagel G (Merck) preparadas como se ha descrito en el caso de los aminoácidos (3.1.7.2).

Los disolventes de desarrollo usados han sido Sg III , Sg IV y Sg V (Tabla II, pág. 68).

Como revelador se ha utilizado una solución de KMnO_4 0,1M y H_2SO_4 10% (1:3), calentando a continuación el cromatograma durante 5 minutos a 105°C .

3,3 Ensayos con la madera

3.3.1 Toma y preparación de las muestras

Las muestras de madera utilizadas en estos ensayos procedían de árboles recién talados. Las secciones de tronco de 0,5 m de longitud, trasladadas inmediatamente al laboratorio , fueron cortadas transversalmente hacia la mitad, aprovechando sólo un disco central de unos 20 cm de espesor. En este disco se ha separado la corteza, que no ha sido utilizada, la albura, el duramen y, en caso de existir, la zona de reacción. La made-

ra de estas tres últimas partes se muele en un molino y se conserva en una cámara frigorífica a -18°C hasta su extracción. El tanto por ciento de madera seca se determina como en el caso del líber (3.1.1).

Detalles sobre las estaciones forestales de donde proveían las muestras se encuentran en el apartado correspondiente de resultados (4.3.1).

3.3.2 Preparación de los extractos

Las muestras molidas se someten a un proceso de extracción que consta de los siguientes pasos:

Extracción con éter de petróleo. En un extractor Sohylet de 500 ml de capacidad se extraen 50 g de madera molida durante 10 horas con éter de petróleo, para separar las sustancias grasas. La solución obtenida -en todas las muestras, de color rosa claro- se evapora en un Rotavapor a presión reducida y constituye el "extracto de éter de petróleo".

Extracción con cloroformo. La madera procedente de la operación anterior, se extrae en el mismo dispositivo con cloroformo, nuevamente durante 10 horas. El extracto presenta diferente aspecto, según se trate de muestras de albura, de duramen o de zona de reacción. Se evapora como en el caso anterior en un Rotavapor a presión reducida hasta sequedad, obteniendo así el "extracto de cloroformo".

Extracción con acetona. El residuo de madera procedente de la extracción con cloroformo es extraído por último con acetona en las mismas condiciones. El extracto, que también puede presentar aspecto diferente según la madera de origen, constituye el "extracto de acetona".

3.3.3 Examen cromatográfico de los extractos

Los extractos obtenidos por el procedimiento anterior (3.3.2) se examinan cromatográficamente sobre capa fina en placas de silicagel G, preparadas como ya se ha descrito para el a nálisis de aminoácidos (3.1.7.2), utilizando como disolventes de desarrollo Sg III, Sg IV, Sg V, Sg VI y Sg VII (Tabla II, pág. 68) en técnicas mono y bidimensionales.

La posición de las sustancias se determina con el uso de los siguientes reveladores:

- KMnO_4 0,1M - H_2SO_4 (1:3) (RUDLOFF y SATO⁽¹⁰⁸⁾)
- ácido fosfomolibdico
- ácido diazobenzolsulfónico (FREUDENBERG y KNOF⁽⁸³⁾)
- Flin-Ciocalteau
- sal de azul sólido

La placa debe ser calentada después del uso de los reveladores durante 5 minutos a 105°C.

Para las placas con fines preparativos, se toman 175 g de gel de sílice G (Merk) y 420 ml de agua destilada (suficien-

te para cinco cromatoplasmas) y se extiende sobre éstas con un aplicador Desaga. Las placas se raspan por zonas o bien totalmente, según el experimento, y las sustancias adsorbidas se eluyen con acetona (ALCUBILLA⁽¹⁴⁾).

T a b l a II

Disolventes de desarrollo utilizados en los análisis
cromatográficos sobre capa fina

Poliamida

- P I agua - etanol - etilmetilcetona - acetilacetona (65:15:15:5)
P II cloroformo - metanol - etilmetilcetona (60:26:14)

Celulosa

- C I n-butanol - ácido acético - agua (4:1:5) .
C II ácido acético del 6%
C III n-butanol - acetona - dietilamina - agua (30:30:6:15)
C IV fenol - agua (75:25), equilibrando la fase acuosa con una
 disolución de amoniaco al 3%; pH 7,1-7,3

Silicagel G

- Sg I cloroformo - metanol - amoniaco 17 % (40:40:20)
Sg II fenol - agua (75:25)
Sg III cloroformo - ácido acético (9:1)
Sg IV tolueno - dioxano - agua (1:1:1)
Sg V cloroformo - metanol (95:5)
Sg VI cloroformo - acetato de etilo (9:1)
Sg VII benzol - acetato de etilo - agua (60:30:15)
-

3.4 Ensayos biológicos

Para medir la acción inhibidora frente a *Fomes annosus* de las muestras molidas del líber y de la madera, así como de sus extractos y de la resina, se han realizado ensayos biológicos en placas Petri sobre sustrato de agar-malta, siguiendo el método descrito por LAATSCH et al.⁽⁷⁾.

La solución nutritiva de agar-malta se prepara de la forma siguiente:

30 g de agar dividido en trozos pequeños se calientan con precaución en un erlenmeyer de 2 litros con 1000 ml de agua destilada hasta que se disuelve el agar. A la solución caliente se le añaden 60 g de extracto de malta disueltos en 500 ml de agua corriente, y se revuelve para que se mezcle bien. A continuación se cubre el matraz con papel de estaño y se esteriliza en un autoclave a 124°C y 1,5 at durante 5 minutos.

1 g de las muestras molidas del líber o de la madera, o bien una cantidad de extracto equivalente a la contenida en dicho gramo, se coloca en una placa Petri añadiendo a continuación 20 ml de la solución de agar-malta, moviendo el contenido de la placa, de forma que se reparta homogéneamente.

Una vez esterilizado el medio base, en iguales condiciones que las utilizadas para la solución de agar, se procede a su inoculación con el hongo. Los inóculos, de 5 mm de diámetro, pro-

ceden de un cultivo puro de *Fomes annosus* de fecha reciente en placas Petri sobre agar-malta. Todos los inóculos utilizados en una serie de ensayos se toman de una misma placa, y dentro de ella, de la misma zona de crecimiento. Las placas Petri ya inoculadas se incuban a 23-24°C durante ocho días, al cabo de los cuales el micelio de las muestras testigo ha alcanzado el borde de las mismas. La diferencia entre los diámetros del micelio de sarrollado en la placa testigo y el formado en la muestra a investigar, expresada en tanto por ciento respecto al crecimiento del hongo en la primera, nos da el valor de la inhibición relativa.

Los ensayos biológicos realizados en esta investigación han sido llevados a cabo en colaboración con el Dr. G. Wenzel.

3.5. Análisis de las acículas

Los cambios en el abastecimiento de los árboles con elementos minerales nutritivos, se han seguido fundamentalmente mediante el análisis de las acículas. Los elementos determinados han sido fósforo, potasio, calcio, magnesio, manganeso, hierro y nitrógeno. Las concentraciones se han expresado en % o ppm de peso seco de acículas molidas.

3.5.1 Toma de muestras y preparación de la solución-base

La recolección de las acículas se ha llevado a cabo al final del periodo de actividad vegetativa (octubre-noviembre) tomando solamente las acículas formadas en el año de la recolección y procedentes del extremo superior del tronco del árbol. Para cada experimento se han reunido las muestras procedentes de diez árboles en una sola. En casos excepcionales, que serán mencionados a su tiempo, se ha trabajado con menos material.

En el laboratorio las muestras se lavan con agua destilada y se secan en estufas con ventilación a 65°C . Una vez secas se desprenden de las ramas y se muelen en un turmix, manteniéndolas a continuación a 65°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo se las introduce en un desecador y se las deja enfriar.

Se pesan muestras de 2 g en crisoles de cuarzo y se mantienen durante 16 horas entre $550-600^{\circ}\text{C}$. Las cenizas una vez frías se humedecen con unas gotas de agua y se añaden 10 ml de HCl del 16%, se hace hervir suavemente la mezcla teniendo cuidado de taparla con un vidrio de reloj, y se filtra en un matraz aforado de 100 ml, lavando el crisol y el filtro repetidamente. Se adicionan 40 ml de HCl del 10% y se enrasa el matraz con agua destilada, obteniendo de esta forma una solución clorhídrica al 5%, "solución-base", en la que se determinan fósforo, potasio, calcio, magnesio, manganeso y hierro.

3.5.2 Determinación colorimétrica de fósforo

Se realiza según el método de GERICKE y KURMIES⁽¹⁰⁹⁾. El fósforo, al reaccionar con las soluciones de vanadato y molibdato amónicos forma un complejo estable de color amarillo, cuya estructura no está bien determinada.

Soluciones y reactivos

- A) Solución de vanadato de amonio al 0,25%. 2,5 g de vanadato de amonio se disuelven en 500 ml de agua hirviendo. A la disolución, una vez enfriada, se le añaden 20 ml de ácido nítrico concentrado y se lleva la solución con agua hasta 1 litro.
- B) Solución de molibdato de amonio al 5%. Se disuelven 50 g de molibdato amónico en agua a 50°C. Una vez fría se lleva la disolución a 1 litro.
- C) Acido nítrico diluido ($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$, 1:2)
- D) Disolución patrón: KH_2PO_4 en agua.

Método

- 5 ml de la solución-base se evaporan a sequedad en un vaso de precipitado. Al residuo se le añaden 2,5 ml de ácido nítrico diluido y se hace hervir un poco para transformar los pirofosfatos en ortofosfatos. La solución resultante se pasa cuantitativamente a un tubo de ensayo de 25 ml graduado.

- Se añaden 2,5 ml de la solución A), y a continuación 2,5 ml de la solución B) y se llena con agua hasta 25 ml. El contenido de los tubos se revuelve con una varilla de vidrio.
- Se deja reposar y al cabo de 30 minutos se mide la intensidad del color en un espectrofotómetro a $436\text{ m}\mu$, en cubetas de 1 cm de espesor frente a la prueba en blanco.
- La curva de calibrado se construye con disoluciones que contengan 100, 200, 300 y $400\gamma\text{P}$ por ml, por dilución de la solución patrón.

3.5.3 Determinación de potasio, calcio y magnesio

Los elementos potasio, calcio y magnesio han sido determinados directamente en la solución-base; potasio y calcio por fotometría de llama en un fotómetro de llama Eppendorf, y magnesio por espectrofotometría de llama en un espectrofotómetro Zeiss con un accesorio adecuado a estas medidas.

Para el potasio se utiliza como gas de combustión una mezcla de propano y aire. La solución patrón, preparada con KCl, contiene $100\gamma\text{K}$ por ml de HCl 5%.

En el caso del calcio se emplea una mezcla de acetileno y aire como gas de combustión, y la solución patrón se prepara con hidróxido de calcio, a una concentración de $100\gamma\text{Ca}$ por ml de HCl 5%. En la determinación de magnesio se emplea una mezcla de oxígeno y acetileno. La solución patrón se prepara con MgO , y

contiene 50mg por ml de HCl 5%.

3.5.4 Determinación colorimétrica de manganeso

La determinación de manganeso se ha llevado a cabo según el método descrito por SANDELL⁽¹¹⁰⁾. Consiste en una oxidación mediante peryodato sódico de Mn^{2+} a MnO_4^- .

Disoluciones y reactivos

- A) Acido nítrico diluido ($HNO_3:H_2O$, 17:483)
- B) Acido fosfórico concentrado
- C) Peryodato sódico
- D) Solución patrón: $MnSO_4$ en agua

Método

- 5 ml de la solución-base se evaporan a sequedad. Al residuo se le añaden 1,5 ml de la disolución A), para eliminar el influjo de Fe^{2+} , Cl^- ..., la solución se hace hervir un poco y se pasa a un tubo de ensayo graduado.
- Se adiciona 1 ml de la solución B), para acomplejar al hierro, y se llena el tubo hasta 10 ml con la solución A).
- Se añade una punta de espátula de peryodato sódico, se revuelve bien, y se colocan los tubos de ensayo en una gradilla de metal, manteniéndolos en un baño de agua hirviendo no muy fuerte durante una hora.
- Al cabo de este tiempo se dejan enfriar y, una vez frías, se llevan exactamente con la solución A) a 10 ml, revol -

viéndolas bien a continuación con una varilla de vidrio.

- La intensidad del color del MnO_4^- formado se mide en un espectrofotómetro frente a la prueba en blanco en cubetas de 1 cm de espesor a una longitud de onda de 525 m μ .
- La curva de calibrado se construye aplicando el método a disoluciones que contengan de 50-150 μMn por ml, obtenidas a partir de la disolución patrón de Mn.

3.5.5 Determinación colorimétrica de hierro

Ha sido realizada con 1,10-fenantrolina según el método descrito por SANDELL⁽¹¹⁰⁾, utilizando acetato sódico en lugar de citrato. El ion ferroso forma con 1,10-fenantrolina, a pH 4,5, un complejo estable de color rojizo a un pH comprendido entre 2 y 9. Los iones Fe^{3+} son reducidos a Fe^{2+} con hidroquinona.

Disoluciones y reactivos

- A) Acido clorhídrico diluido: 20 ml de HCl 20% se diluyen con agua a 125 ml.
- B) Azul de bromofenol: Solución al 0,04% en agua
- C) Solución de acetato sódico al 25% en agua
- D) Solución de hidroquinona al 1% en agua (se debe preparar para cada determinación)
- E) Solución de 1,10-fenantrolina al 0,5% en agua
- F) Solución patrón: Para prepararla se disuelve alambre de hierro en HCl y se diluye con agua.

Método

Con el fin de conocer la cantidad de acetato sódico necesaria para conseguir un pH por debajo de 3,5, que es el más adecuado en nuestro caso para evitar interferencias: pirofosfatos, etc., se realiza un ensayo previo añadiendo a 3 ml de la solución-base 3 gotas de azul de bromofenol y solución de acetato sódico hasta que la prueba vire a azul pálido.

- En un tubo de ensayo conteniendo 3 ml de la solución-base se adicionan 1 ml de la solución de hidroquinona, 1 ml de la solución de 1,10-fenantrolina y tanta cantidad de acetato sódico como haya necesitado el ensayo previo.
- Se llena este último tubo hasta 12 ml con agua, se mezcla bien y se deja reposar una hora a la temperatura ambiente, para el desarrollo del color.
- La intensidad del color se mide en un espectrofotómetro en cubetas de 1 cm de espesor a una longitud de onda de 508m μ , frente a la prueba en blanco.
- La curva de calibrado se prepara a partir de la solución patrón con disoluciones que contengan entre 5-30 γ de Fe por ml.

3.5.6 Determinación de nitrógeno

Para la determinación, tanto en las acículas como en otros tejidos o en extracto de los mismos se ha empleado el método

do de KJELDAHL⁽¹¹¹⁾ -transformación del N en NH_3 y posterior titulación de éste- convenientemente adaptado (MÜLLER y FIEDLER⁽¹¹²⁾), según el siguiente procedimiento:

En matraces Kjeldahl de 100 ml se pesan exactamente alrededor de 400 mg de polvo de acículas molidas, se adicionan 5 g de una mezcla reactiva de selenio (mezcla reactiva de selenio según Wieninger, de la casa Merck) y 12 ml de H_2SO_4 concentrado. Se agitan los matraces para que se mezcle bien. Se les hace hervir hasta que su contenido se haya convertido en un líquido de color verde claro (aproximadamente media hora), en el cual ya no existe materia orgánica y el N se encuentra en forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se les deja enfriar. Una vez fríos se diluye la solución con agua destilada lentamente hasta unos 50 ml, pasándola al matraz de destilación de un aparato Parnas-Wagner. Se añade NaOH del 35-40% hasta un pH fuertemente alcalino (unos 40 ml) y se destila por arrastre de vapor, recogiendo el destilado (amoníaco disuelto en agua) sobre ácido bórico del 1% (basta unos 15 ml), que contiene como indicador unas gotas de una mezcla de azul y rojo de metileno. Cuando el ácido bórico haya pasado de rosa a verde, se debe seguir la destilación durante un cuarto de hora más. La solución que contiene el amoníaco se titula con HCl 0,05N.

Si se utiliza el método para otros tejidos se debe acomodar la concentración del HCl a la del N en el tejido de que se trate. En el caso del líber se emplea HCl 0,005N.

3.6 Determinación del contenido de agua en el suelo

En el experimento que tiene por objeto estudiar el influjo de las sequías periódicas sobre la acción inhibidora del líber, se ha examinado la variación del contenido en agua del suelo por medio de una sonda neutrónica (de la casa Berthold en Wildbad) (*). Las medidas han sido llevadas a cabo por el Dr. G. Wenzel.

En las parcelas tomadas como control se han realizado además cálculos teóricos de la variación del contenido en agua del suelo, siguiendo el método elaborado por LAATSCH^(113,114). Los valores de la evaporación potencial se han calculado con ayuda de las tablas de THORNWAITE y MATHER⁽¹¹⁵⁾. Una descripción detallada de este método, aplicado a nuestro caso particular, se encuentra en WENZEL y DIAZ-PALACIO⁽¹³⁾.

(*) Al Dr. Hebestreit de la Landestelle für Gewässerkunde de Munich le agradecemos cordialmente el haber podido utilizar esta sonda.

4. Resultados y discusión

4.1 Investigaciones sobre el líber

Como ya se dijo en la introducción, el objeto fundamental del presente trabajo es el estudio de la variación del efecto inhibitor del líber del abeto rojo sobre el *Fomes annosus* en relación con el estado de nutrición de los árboles, precisamente bajo aquellas condiciones ecológicas en que se suele presentar la "podrición del duramen". Dicho efecto inhibitor viene de terminado en cada caso por la interacción entre las sustancias fungitóxicas y las sustancias que estimulan el crecimiento del hongo, y está sometido además al influjo de otros factores que afectan de forma general a la concentración de ambos grupos de sustancias en los árboles (HILLIS⁽⁸²⁾). De aquí que para llevar a cabo nuestras investigaciones haya sido necesario en primer lugar elaborar métodos apropiados para la determinación cuantitativa de dichas sustancias. En el apartado 4.1.1 se hacen algunas consideraciones sobre estos métodos y se exponen las razones que nos han movido en su elección.

A continuación, apartado 4.1.2, se consignan los experimentos que se han realizado con objeto de estudiar la variación de la composición química y del efecto inhibitor del líber en relación con algunos factores, tales como la posición de la toma de muestras en el árbol, la estación del año, etc., base imprescindible para poder investigar las relaciones entre el estado de

nutrición del árbol y la acción inhibidora de su líber, cuyos resultados se exponen en el apartado 4.1.3.

4.1.1 Consideraciones acerca de los métodos empleados en la determinación cuantitativa de sustancias inhibidoras y sustancias estimulantes del crecimiento del Fomes annosus

El carácter inhibidor que posee el líber del abeto rojo viene determinado, como ya se ha mencionado varias veces, por la acción conjunta de las sustancias tóxicas que inhiben el crecimiento del hongo -sustancias resinosas y polifenoles- y de las sustancias que por el contrario lo favorecen -hidratos de carbono, compuestos nitrogenados-.

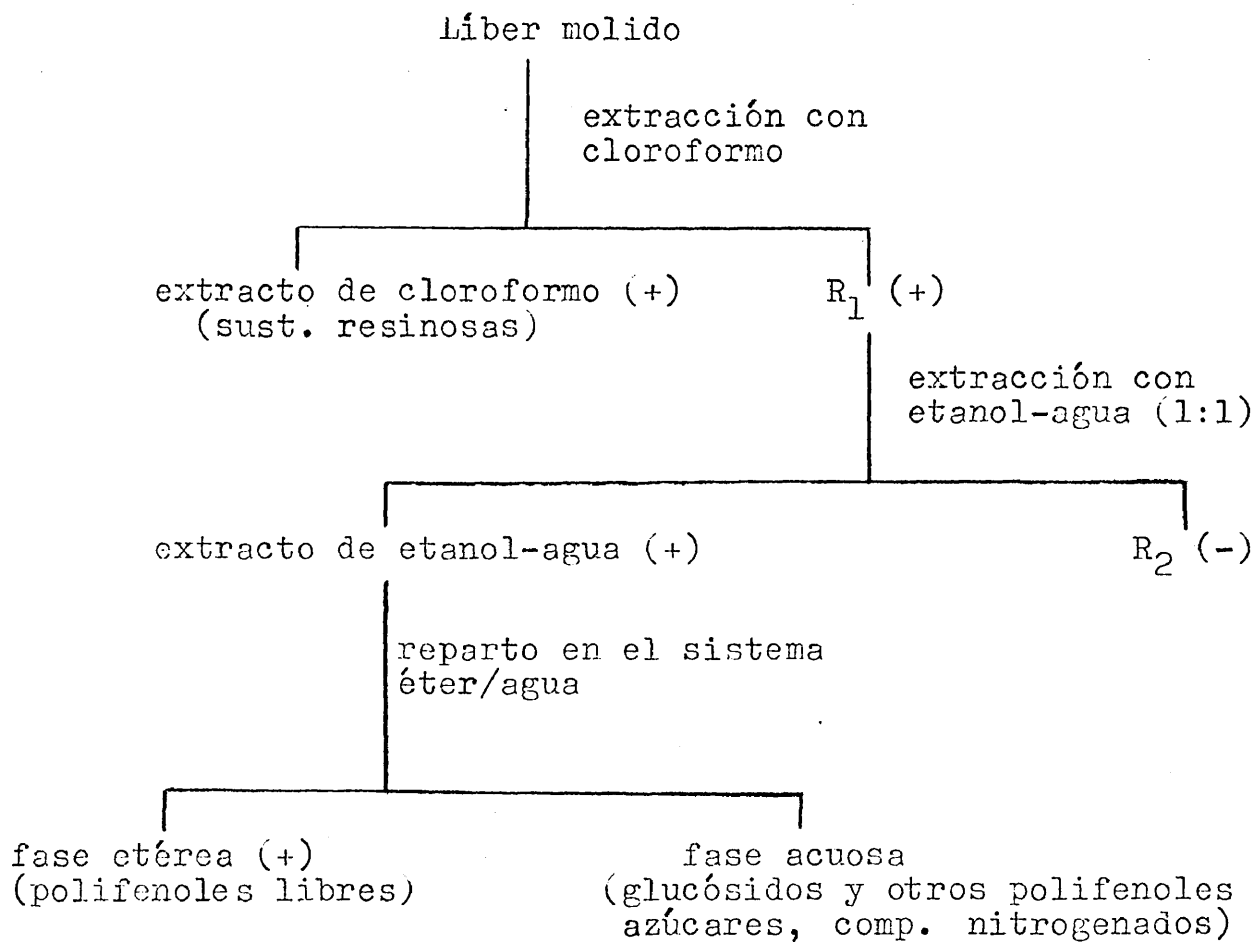
Para realizar el análisis cuantitativo de ambos tipos de sustancias es necesario, en primer lugar, someter al líber a un proceso de extracción que las remueva totalmente y luego verificar la determinación de las mismas en los extractos obtenidos. Los métodos han sido detallados en el apartado 3.1 del capítulo Material y métodos. En los apartados siguientes haremos algunas consideraciones sobre los mismos.

4.1.1.1 Extracción del líber, propiedades fungitóxicas de los extractos y examen cromatográfico de los mismos

El proceso de extracción a que el material se somete está representado en el esquema I (pág. 82).

E s q u e m a I

Proceso de extracción del líber del abeto rojo



R = residuo de la extracción

(+) = En ensayos biológicos con *Fomes annosus* presenta carácter inhibidor

(-) = En ensayos biológicos no presenta carácter inhibidor

Primeramente se realiza una extracción con cloroformo para separar las sustancias grasas y resinosas, según indican GRASSMAN et al.⁽⁹⁹⁾. El extracto inhibe el crecimiento del micelio del *Fomes annosus*, como ya habían comprobado LAATSCH et al.⁽⁷⁾, pero en una proporción mucho menor que el residuo procedente de la extracción, R_1 , por lo que éste se somete a una nueva extracción, esta vez con etanol-agua (1:1). Con este disolvente se extraen según ANDRES⁽¹⁰⁰⁾ prácticamente todos los polifenoles monomoleculares aparte de otras sustancias no fenólicas como azúcares, aminoácidos y pequeñas cantidades de fenoles polimerizados.

El residuo R_2 no presenta carácter inhibitor frente a *Fomes annosus*, de donde se deduce que la totalidad de las sustancias tóxicas se encuentran en el extracto de cloroformo y en el de etanol-agua. Tampoco favorece el crecimiento de los hongos, lo que indica que han sido también extraídos los azúcares y compuestos nitrogenados. Contiene sin embargo almidón (JEREMIAS⁽¹¹⁶⁾), que puede ser utilizado por el hongo en la naturaleza como fuente de elementos nutritivos y fuente de energía. Debido a ello, aunque el efecto de este compuesto no se puede medir en ensayos biológicos sobre agar-malta, por no ser soluble en agua, en algunos casos se ha juzgado conveniente determinar su concentración en el residuo.

El extracto de etanol-agua debe su carácter inhibitor, se

gún demostraron LAATSCH et al.⁽⁷⁾ y se ha mencionado en la parte teórica, a su contenido en polifenoles monomoleculares, los cuales se pueden extraer del mismo con acetona. Según ALCUBILLA⁽¹⁴⁾ el examen cromatográfico de ambos extractos, el de etanol-agua y el de acetona, indica la presencia en ellos de los mismos polifenoles. Los extractos de etanol-agua analizados en nuestro estudio se han mostrado también idénticos cromatográficamente a los extractos de acetona de este autor. Para mejor comparar los resultados se han utilizado los mismos disolventes de desarrollo.

La Fig. 1 reproduce un cromatograma de papel al que se

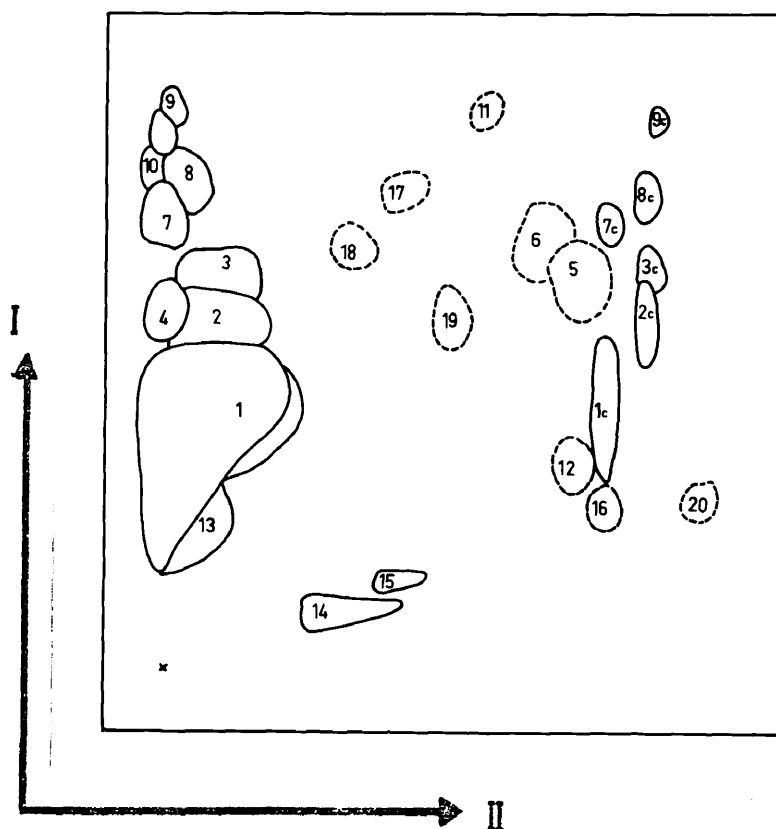


Fig. 1. Cromatograma sobre papel del extracto de etanol-agua

1^a dirección: I

2^a dirección: II

--- sustancias puestas de manifiesto con reactivos

sustancias fluorescentes en UV

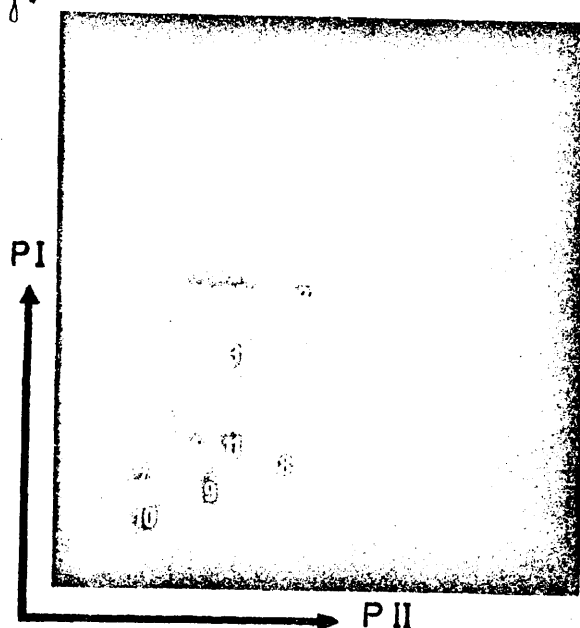
c = isómero cis

han aplicado 2 mg de extracto de etanol-agua procedente de líber del tronco.

La fotografía de la Fig. 2 corresponde al análisis del mismo extracto por cromatografía de capa fina sobre poliamida, en este caso se han aplicado 600γ.

Fig. 2. Cromatograma sobre poliamida del extracto de etanol-agua de líber del tronco a la luz UV revelado con AlCl_3

1ª dirección: P I
2ª dirección: P II



De la comparación de ambos cromatogramas (Fig. 1 y 2) , se deduce que en el cromatograma sobre poliamida se detectan menos sustancias que sobre papel, pero la separación obtenida es mejor y sobre todo el desarrollo es mucho más rápido.

Los números de las sustancias corresponden a los mencionados por ALCUBILLA⁽¹⁴⁾. Las sustancias sin numerar en estos cromatogramas no aparecen en los suyos, lo cual puede ser debido a la diferente procedencia del matrial o bien a haber sido aplicada en nuestro caso una mayor cantidad de sustancia.

Los métodos de aislamiento e identificación de los principales polifenoles presentes en el extracto pueden encontrarse

en ALCUBILLA⁽¹⁴⁾. Las sustancias 7, 8 y 9 han sido identifica - das como derivados del estilbeno: piceatanol, éter monometílico del piceatanol y resveratrol, y presentan a la luz ultravioleta una fluorescencia azul-violeta. Sus isómeros cis 7c, 8c y 9c pre - sentan la misma coloración. En el caso de las sustancias 9 y 9c el color es muy débil, pues se encuentran en general en concen - traciones pequeñas, pero si se mantiene el cromatograma bajo la lámpara ultravioleta algunos minutos se tornan amarillentas y se hacen visibles incluso a concentraciones muy bajas. Las manchas 10 y 11 corresponden a quercetina y taxifolina. La primera se puede ver a la luz ultravioleta directamente si se encuentra en grandes concentraciones presentando una fluorescencia amarillo - anaranjada. Ambas se detectan mejor rociando el cromatograma con solución alcohólica de $AlCl_3$, reactivo especial para flavonoi - des, y observándolo a continuación a la luz ultravioleta. La quer - cetina muestra una fluorescencia amarillo-verdosa y la taxifoli - na amarilla.

Las manchas 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a los glucósi - dos de los componentes 7,8,9,10 y 11 respectivamente. Las colo - raciones que presentan a la luz ultravioleta con y sin el uso de reactivos son las mismas que las de sus agluconas. Al exami - nar en nuestros trabajos los cortes transversales del tronco y de las raíces -preservados de la oxidación-, a la luz ultravio - leta, se ha observado en todos los casos un anillo de fuerte

fluorescencia azul violeta correspondiente a la corteza interna. Se debe indudablemente a la presencia de los estilbenos (Fig.3).

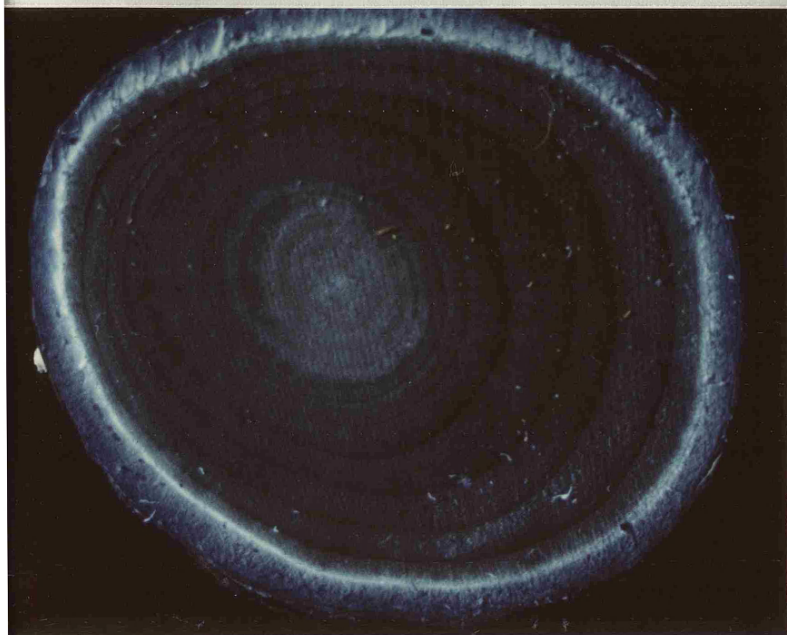


Fig. 3. Corte transversal de una raíz de abeto rojo fotografiada a la luz UV

Las manchas 6, 12, 16 y 19 producen una coloración rosa con vanillina-HCl. La sustancia 6 es catequina. La 12 presenta las propiedades de la epicatequina. Las manchas 16 y 19 corresponden a dos leucoantocianinas.

El resto de las sustancias no están identificadas. Las manchas 17 y 18 se ponen de manifiesto con solución alcohólica de AlCl_3 ; la mancha 20 aparece al cabo de algún tiempo por oxidación a la luz solar. Las manchas 13, 14 y 15 y todas las no numeradas presentan fluorescencia violeta.

Las sustancias que aparecen en estos cromatogramas se han encontrado en todas las pruebas analizadas. Si se aplican concentraciones mayores de extracto se pueden detectar otras pero el cromatograma pierde claridad.

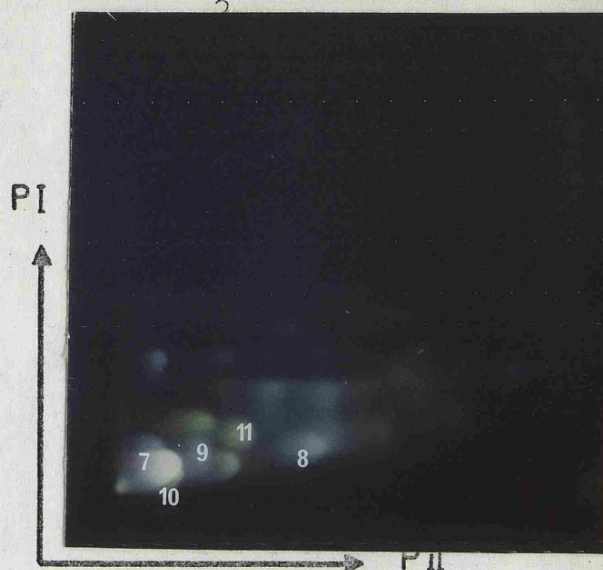
Dado que los polifenoles que aparecen en el extracto de acetona son los mismos que los del extracto de etanol-agua y en cambio no van acompañados de azúcares y otras sustancias, la extracción con acetona se presenta como un buen método de separación. Sin embargo, no es apropiado para nuestras investigaciones, en primer lugar, por el tiempo que sería necesario emplear en el análisis de un número elevado de pruebas, y en segundo, porque las condiciones en que se realiza esta extracción favorecen la polimerización de algunos polifenoles, lo que da lugar a pequeñas diferencias entre las concentraciones relativas de los distintos grupos de fenoles en el extracto de etanol-agua y en el de acetona. Por esta razón, en lugar de extraer los polifenoles del extracto de etanol-agua con acetona, se ha preferido determinar cuantitativamente su concentración en ese extracto por métodos colorimétricos. Como la mezcla es muy compleja, no se puede realizar directamente una determinación global a partir de la solución del extracto, ya que podría conducir a resultados erróneos, por lo que se procede a un reparto del mismo en el sistema éter/agua.

La fase etérea -que es idéntica cromatográficamente a la obtenida por ALCUBILLA a partir del extracto de acetona- contiene polifenoles libres (ALCUBILLA⁽¹⁴⁾) y presenta un fuerte carácter inhibitor aunque su contribución a la acción inhibidora del líber es reducida por encontrarse en concentraciones peque-

ñas. La fotografía de la Fig. 4 reproduce un cromatograma sobre poliamida de dicha fase revelado con AlCl_3 .

Fig. 4. Cromatograma sobre poliamida de la fase etérea del extracto de etanol-agua a la luz UV revelado con AlCl_3

1^a dirección: P I
2^a dirección: P II



Se han aplicado 100 γ de sustancia. Como se puede apreciar, su composición es muy compleja y contiene, aparte de las agluconas identificadas un gran número de sustancias desconocidas. En ella se encuentra también una pequeña proporción de catequina y otras sustancias que producen coloración rosa con vanillina-HCl, aproximadamente un 5% del contenido total del líber en estos compuestos.

En la fase acuosa -en la que cromatográficamente se pueden detectar los mismos fenoles identificados por ALCUBILLA⁽¹⁴⁾ en la misma fase del extracto de acetona- se encuentran los glucósidos -de los cuales procede la mayor parte del carácter inhibidor del líber (WENZEL et al.⁽¹⁵⁾)- correspondientes a las aglu

conas de la fase etérea, y la mayor proporción de catequinas (*) y leucoantocianinas (95%) aparte de otras sustancias polifenólicas no identificadas.

En la Fig. 5 está reproducido fotográficamente un cromatograma sobre poliamida de esta fase. Se han aplicado 560 γ de sustancia. Las sustancias que producen coloración rosa con vanilina-HCl (catequinas y leucoantocianinas) no se pueden detectar en estas placas por no resistir la poliamida la acción de

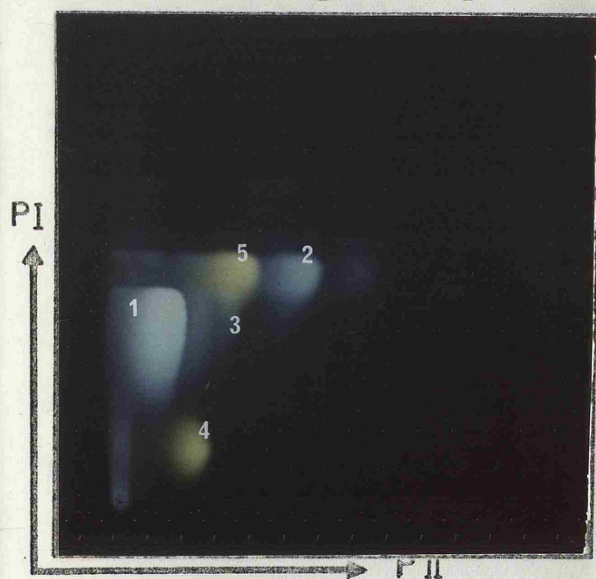


Fig. 5. Cromatograma sobre poliamida de la fase acuosa del extracto de etanol-agua a la luz UV revelado con AlCl_3

1^a dirección: P I
2^a dirección: P II

los ácidos. Para determinar su presencia se ha utilizado cromatografía sobre papel o sobre placas de celulosa empleando los disolventes de desarrollo C I y C II (Tabla II, pág. 68).

Esta fase contiene también azúcares y pequeñas cantida-

(*) Las catequinas, aunque son polifenoles libres, por su mayor afinidad por el agua vienen en esta fase y no en la etérea

des de compuestos nitrogenados y otras sustancias solubles en agua. Con el fin de comprobar el influjo de todas ellas sobre el crecimiento del hongo, se han separado de los constituyentes fenólicos mediante una columna cromatográfica de poliamida (3.1.4.2). Los ensayos biológicos frente al *Fomes annosus* muestran que el crecimiento del hongo se ve favorecido ligeramente por las mismas, en una medida que depende de su concentración en el árbol. De ellas se han determinado cuantitativamente los azúcares y en algunos casos la concentración de nitrógeno total y los aminoácidos.

4.1.1.2 Determinación de fenoles

Para el análisis cuantitativo de los constituyentes fenólicos de ambas fases se han empleado, como se dijo anteriormente, métodos colorimétricos.

Los polifenoles libres de la fase etérea han sido determinados con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que está reiteradamente recomendado en la bibliografía sobre el tema para este tipo de determinaciones (SWAIN y GOLDSTEIN⁽¹¹⁷⁾, SEIKEL⁽¹¹⁸⁾). Este reactivo oxida los fenoles reduciéndose a una mezcla de óxidos de molibdeno y wolframio de color azul. En nuestras determinaciones hemos seguido en líneas generales el método de la A.O. A.C. (HORTWITZ⁽¹⁰³⁾), solamente se han variado las proporciones de los distintos reactivos, empleándose además agua destilada

en lugar de solución-tampón. Las lecturas han sido realizadas no a 650 m μ , como proponía este método, sino a 760 m μ , por presentarse a esta longitud de onda el máximo de la curva de absorbancia de los fenoles contenidos en dicha fase. El color es muy estable y los resultados reproducibles.

Debido a la gran cantidad de polifenoles contenidos en esta fase, de la mayoría de los cuales se desconoce la naturaleza, y a la no existencia en el comercio de las sustancias ya identificadas más características, se ha optado por construir la curva de calibrado utilizando como sustancia de referencia un extracto de fase etérea de liber de abeto rojo. Para su preparación se han tomado muestras de 40 árboles de 35-40 años, en apariencia sanos y con un estado de nutrición satisfactorio.

En la fase acuosa se ha realizado primeramente una de - terminación global, también con el reactivo de Folin-Ciocalteu, obteniéndose de esta forma la absorbancia T. Los dos grupos principales de sustancias contenidas en esta fase, glucósidos de estilbenos y flavonoides por una parte, y catequinas y leucoantocianinas por otra, contribuyen sin embargo en distinta medida a esta absorbancia, como se puede deducir de los valores consignadados en la Tabla III (pág. 94) y esto hace necesaria la determinación de ambos grupos por separado.

Con este fin se ha verificado la estimación conjunta de las catequinas (catequina y epicatequina) y leucoantocianinas

con el reactivo de Lindt, que produce una coloración rosa con estas sustancias -pero no con los glucósidos de estilbenos y flavonoides-, cuya intensidad decrece con el tiempo por lo que se han de mantener exactamente los minutos señalados para la lectura a fin de conseguir resultados reproducibles. Como sustancia de referencia para la curva patrón se ha tomado (+) catequina y se ha medido la absorbancia a 500m μ . De esta curva se puede obtener la concentración en la fase acuosa de las sustancias que dan coloración rosa con vanillina-HCl. Ahora bien, estas sustancias reaccionan también con el reactivo de Folin-Ciocalteu (SWAIN y GOLDSTEIN⁽¹¹⁷⁾). Construyendo otra curva patron con (+) catequina y este reactivo, podemos hallar la absorbancia C, correspondiente a la concentración anteriormente calculada. La diferencia entre la absorbancia global T y la absorbancia C de las catequinas y sustancias afines nos permite encontrar la absorbancia G de los glucósidos de estilbenos y flavonoides. La concentración de éstos se obtiene a partir de la curva patrón preparada con rapontina, -3,5,3' trihidroxi, 4'-metoxi estilbeno-, isómero de isorapontina -uno de los glucósidos contenidos en mayor proporción en el líber del abeto rojo-, y el reactivo de Folin Ciocalteu, y midiendo la absorbancia a 760 m μ .

En la Tabla III se consignan los valores de las absor -
bancias correspondientes a la coloración producida por el ex -
tracto de la fase etérea, rapontina y (+) catequina con el reacu

tivo de Folin-Ciocalteu. siguiendo el método descrito en el apartado 3.1.4.1 En los tres casos se ha partido de soluciones de la misma concentración (50 γ / 0,5 ml de metanol).

T a b l a I I I

Absorbancias correspondientes a la reacción de algunos fenoles con el reactivo de Folin-Ciocalteu (Solución: 50γ/0,5ml)

	<u>Absorbancia a 760 mμ</u>
Fase etérea del extracto de etanol-agua del líber	0,595
rapontina (glucósido de rapontigenina)	0,400
(+) catequina.	0,675

Del examen de estos valores se deduce la importancia que tiene en nuestro caso realizar determinaciones parciales de los distintos grupos. Una determinación global a partir del extracto de etanol-agua podría conducir a errores al variar en los árboles las proporciones relativas de los mismos.

Algunos azúcares, entre ellos la glucosa, pueden produ-

cir también una coloración azul con el reactivo de Folin-Ciocalteu si se encuentran en grandes concentraciones. Con el fin de estudiar la posible influencia de éstos y otros componentes no fenólicos de la fase acuosa del extracto de etanol-agua sobre la reacción, se ha procedido a su separación mediante una columna cromatográfica de poliamida. Los fenoles se unen por enlaces de puente de H a los grupos amida, mientras que los azúcares, algunos aminoácidos, etc., pueden ser eluidos con agua. En esta solución se ha llevado a cabo la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu, no dando coloración alguna, incluso para una concentración de sustancias doble de aquella en la que éstas se presentan en el líber del abeto rojo. La coloración azul de las muestras es por tanto debida solamente a la reacción de los fenoles.

4.1.1.3 Determinación de azúcares

Para el análisis del contenido total del líber en azúcares solubles en etanol-agua (1:1) se ha empleado en líneas generales el método de EBELL⁽¹⁰⁵⁾ para este tipo de determinaciones en tejidos de coníferas, es decir, la estimación con el reactivo de antrona. El método incluye un tratamiento previo con carbón activo para eliminar los compuestos fenólicos que podrían interferir.

Como el carbón activo absorbe también pequeñas cantida-

des de algunos azúcares, se han realizado pruebas con componentes puros para estudiar las pérdidas que produce este tratamiento en la concentración de los principales azúcares del líber del abeto rojo: sacarosa, D-glucosa, D-fructosa y rafinosa (JEREMIAS⁽¹¹⁶⁾). La recuperación es total en el caso de los tres primeros. De rafinosa sólo se obtiene un 80%. A pesar de ello se ha elegido el método por presentarse como el más exacto dentro de los comúnmente utilizados para la determinación de azúcares en coníferas y emplearse solamente con fines comparativos (EBELL⁽¹⁰⁵⁾). La única variación introducida en el mismo es la disolución del reactivo de antrona en ácido sulfúrico del 95% y no en disolución alcohólica de sulfúrico, como propone este autor, ya que en nuestras muestras no ha conducido esto último a resultados reproducibles.

Con cada serie de muestras se debe hacer la reacción con una disolución patrón de glucosa, ya que pequeñas variaciones en la temperatura pueden dar lugar a cambios grandes en la absorbencia.

4.1.1.4 Determinación del almidón

El método elegido para la determinación de almidón es uno de los más apropiados para análisis en serie. Es un método de fácil realización y muy sensible. Aunque algunas polialdohexosas y polifruktosas pueden dar también la coloración verde

con el reactivo de antrona, esto no molesta en nuestro caso, ya que lo que propiamente interesa es saber si se han originado diferencias entre las distintas parcelas en los hidratos de carbono insolubles en etanol-agua (1:1).

4.1.1.5 Determinación de aminoácidos

Los aminoácidos libres y algunos péptidos pueden ser extraídos de los tejidos vegetales con etanol-agua (1:1). La determinación de los aminoácidos libres y de los procedentes de la hidrólisis de péptidos se ha realizado con un analizador automático de aminoácidos, que permite a la vez un análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras con una gran exactitud, a partir del extracto crudo de etanol-agua (1:1) o de su fase acuosa. Por medio de cromatografía de capa fina sobre celulosa y silicagel se ha confirmado la identidad de las sustancias.

4.1.2 Variación de la composición química de los extractos y de la acción inhibidora del líber del abeto rojo bajo el in- flujo de diversos factores

Todos los factores que ejercen influencia sobre la concentración de las sustancias inhibidoras y sobre la de aquellas que favorecen el crecimiento del hongo, influyen a su vez indirectamente sobre el efecto inhibidor del líber.

Como sustancias inhibidoras del líber del abeto rojo con

sideramos, como ya se ha dicho, las contenidas en el extracto de cloroformo -fracción resinosa- determinadas por pesada y los polifenoles del extracto de etanol-agua -fracción polifenólica- determinados colorimétricamente como se expone en el apartado 3.1.4.

La acción inhibidora (= efecto inhibidor) de cada una de las dos fracciones para la misma concentración puede variar de árbol a árbol (WENZEL et al.⁽¹⁵⁾), lo que indica diferencias en la composición de ambos extractos entre árboles individuales. En el caso de la fracción resinosa, cuya proporción en el líber es pequeña, estas variaciones tienen una influencia reducida en el efecto inhibidor total. En la fracción polifenólica -de la que procede el mayor efecto inhibidor del líber- las diferencias provienen de distintas proporciones relativas de entre los distintos grupos de fenoles: polifenoles libres, glucósidos, catequinas y leuco-antocianinas, ya que su acción inhibidora es distinta. De aquí que el efecto inhibidor total no se corresponde siempre con la simple suma de las concentraciones de las dos fracciones, pero en cambio se puede explicar por la variación de los distintos grupos. La suma de ambas concentraciones tiene un coeficiente medio de varianza de $\pm 1,5\%$.

Entre las sustancias que favorecen el crecimiento del hongo se han determinado cuantitativamente en estos experimentos los azúcares y en algunos casos la concentración de nitró-

geno.

El valor de la inhibición se ha determinado según se expuso en el apartado 3.4. Coeficiente de varianza $\pm 2,9\%$.

Como factores que pueden influir en la concentración de ambos grupos de sustancias en el líber y de su acción inhibidora se han examinado:

- la posición de las muestras en el árbol
- la edad de los árboles
- la estación del año en que se lleva a cabo la toma de muestras
- el estado de nutrición de los árboles.

Los tres primeros grupos de experiencias son necesarios para poder llevar a cabo el cuarto sobre una base de compara-ción. A este último, al cual están orientados nuestros experi-mentos, se le dedica el apartado 4.1.3.

Probablemente la concentración de estas sustancias de-pende también de factores genéticos. La investigación de los mismos requiere trabajar con idéntico material desde el punto de vista genético, lo que será objeto de otros trabajos dentro del programa "Rotfäule der Fichte". Las diferencias a que pue-den dar lugar entre árboles de la misma especie, por otra par-te en idénticas condiciones, se han querido subsanar tomando pruebas de más de diez árboles en la mayoría de los casos.

Igualmente es posible que varíe la concentración de es-

tas sustancias como consecuencia del ataque del parásito. Estas variaciones también serán objeto de otros trabajos dentro del programa.

4.1.2.1 Influencia de la posición de las muestras en el árbol

Según BRAUN y LULEV⁽²¹⁾, los órganos privilegiados para la infección natural del abeto rojo por el *Fomes annosus* son las raíces de 0,5 a 3 cm de diámetro -raíces medianas-, por poseer una corteza externa muy fina; las raíces más gruesas están protegidas por una corteza externa fuerte que no puede ser atravesada por el hongo mientras esté intacta (BRAUN⁽²⁶⁾, DIMITRI⁽¹⁹⁾), y las raíces más delgadas de 0,5 cm mueren rápidamente como consecuencia del ataque y son repudiadas por el árbol. De aquí que nuestra atención se haya dirigido desde el primer momento a las raíces medianas, investigando su liber o corteza interna.

Para algunos experimentos, sin embargo, que exigen varias tomas de muestras a lo largo del año, es preferible utilizar liber del tronco, y como era probable que la cantidad de los extractos variase con la altura de la toma de muestras, como se conoce de otros árboles (HILLIS⁽⁸²⁾), hemos investigado primeramente esta variación, comparando los valores obtenidos para los distintos grupos de sustancias y para la acción inhibidora a distintas alturas en el tronco con los valores corres

pendientes de las raíces a fin de deducir a qué altura convenía tomar las muestras.

Características de la estación forestal y toma de muestras. Después de unos ensayos previos, orientadores, que nos permitieron iniciar otros experimentos, se eligieron para el definitivo 10 árboles de una estación forestal en las cercanías de Bräunlingen (Schwäbische Alb, Baden-Württemberg). Edad de los árboles 30 años. Altura de los mismos: 12 m.

Se tomaron muestras del líber en las raíces medianas y también en el tronco a 0,5, 1,5, 5 y 10 m de altura, 4 discos ($\phi = 1,5$ cm) en cada posición por árbol, reuniéndose las de cada altura en una muestra común.

Fecha de la toma de muestras: 5 noviembre 1969.

Los resultados obtenidos están consignados en la Tabla IV (pág. 102).

Las concentraciones de los distintos grupos de sustancias se han expresado en % respecto al peso de líber seco. La inhibición relativa en % por 0,5 g de sustancia seca.

Del examen de estos valores se deduce que la acción inhibidora del líber aumenta gradualmente desde las raíces a la cima del árbol y este aumento se corresponde con el de la concentración de la fracción resinosa y los glucósidos. Una variación semejante del efecto inhibidor con la altura han observado JUNG y HUBBES⁽¹¹⁹⁾ en el líber de *Fraxinus excelsior*.

T a b l a IV

Influencia de la posición de las muestras en el árbol sobre la composición química de los extractos y el efecto inhibidor de su líber frente al Pomes annosus
(5-11-69)

Altura	Extr. de cloroformo (sust. resinosas)	Polifenoles libres	Glucósidos	Catequinas	Total sustancias inhibidoras	Azúcares	Inhibición relativa %/0,5 g del líber seco
Raíces medianas	3,16	1,55	25,00	4,96	34,67	5,80	37,5
0,5 m	3,04	1,50	25,24	4,46	34,24	5,00	38,0
1,5 m	3,40	1,30	25,93	4,41	35,04	5,25	38,2
5,0 m	3,89	1,20	28,50	3,73	37,32	7,40	39,0
10,0 m	4,51	1,25	28,20	3,60	37,56	9,90	40,0

Las catequinas y leucoantocianinas disminuyen de abajo a arriba, pero a esas concentraciones su importancia en la acción inhibidora es pequeña. Igualmente la variación de los polifenoles libres carece de importancia.

La concentración de los azúcares experimenta un aumento en sentido vertical, lo cual puede haber debilitado el efecto de las sustancias inhibidoras. La concentración de nitrógeno no ha sido determinada.

Teniendo como base estos resultados parece conveniente tomar las muestras a una altura comprendida entre 0,5 y 1,5 m y se ha fijado como altura standard 1 m sobre el nivel del suelo.

Esta correspondencia entre la composición química y el efecto inhibidor del líber de las raíces medianas y los del tronco a la altura de 1 m se ha encontrado también en árboles procedentes de otras estaciones forestales de edades diferentes y para distintas épocas del año con una sola excepción: las raíces de abetos rojos abonados con nitrógeno, para una concentración de este elemento comprendida entre ciertos límites, poseyendo la misma cantidad de sustancias fungitóxicas que el tronco, presentan un efecto inhibidor menor. De estos resultados se hablará detalladamente en el apartado 4.1.5.

En la Tabla V (pág. 104) están consignados algunos ejemplos de los valores obtenidos en los análisis del líber del

composición química de los extractos y el efecto inhibidor frente al Pomes annosus del líber de las raíces cor
a 1 m de altura

Fecha de la toma de muestras	Posición (*)	Extra. de cloroformo sust. resinosas	Polifenoles libres	Glucósidos	Catequinas	Total	
						sustancias inhibidoras	Azúcares
						% del líber seco	
14.11.70	tronco	7,50	1,16	23,61	4,15	37,42	7,46
	raíces	5,05	1,37	23,00	4,25	33,47	7,90
12. 2.70	tronco	3,65	1,25	27,82	4,61	37,33	8,13
	raíces	2,94	1,31	26,60	6,52	37,37	10,46
19. 9.70	tronco	3,15	0,80	20,70	4,30	28,95	4,50
	raíces	2,85	0,75	21,50	3,10	28,20	5,76
5. 5.71	tronco	3,29	1,20	24,43	4,15	33,07	5,83
	raíces	2,32	1,37	23,00	4,28	30,97	6,10

tronco y de las raíces. En cada caso se ha tomado el valor medio de 5 árboles.

En éstos y en todos los casos examinados, las raíces han presentado siempre una concentración más pequeña en sustancias resinosas -extracto de cloroformo- que el tronco. La concentración de glucósidos y agluconas y la de catequinas y leucoantocianinas es similar en ambos con pequeñas variaciones, de aquí que la concentración total en sustancias inhibidoras sea en general ligeramente menor en las raíces.

Por otra parte la concentración de los azúcares es en todos los casos analizados mayor en las raíces que en el tronco, lo que proporcionaría a los hongos una fuente de elementos nutritivos. El hecho de que las raíces contengan más hidratos de carbono que el tronco, es conocido en otras coníferas. PLATT et al.⁽¹²¹⁾ atribuyen la menor resistencia de la albura de raíces de varias especies de pinos frente a la del tronco, al mayor contenido de las primeras en sustancias de reserva, entre ellas azúcares libres, almidón y compuestos nitrogenados.

Desde el punto de vista cualitativo, en el líber del tronco y en el de las raíces se encuentran las mismas sustancias aunque varían las proporciones. La Fig. 6 reproduce un cromatograma del extracto de etanol-agua del líber de las raíces. La comparación del mismo con la fotografía de la Fig. 2 (pág.85) correspondiente al extracto de etanol-agua de líber del tronco

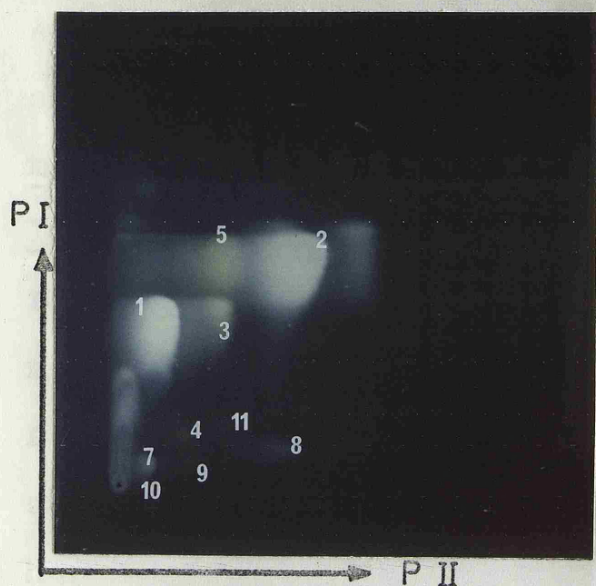


Fig. 6. Cromatograma sobre poliamida del extracto de etanol-agua de líber de las raíces medianas de abeto rojo

1^a dirección: P I
2^a dirección: P II

del mismo árbol, nos presenta como diferencia fundamental entre ambos que en las raíces la concentración de isorapontina -sustancia 2- es mayor que la del glucósido de piceatanol -sustancia 1- y en el tronco ocurre el caso contrario. Este fenómeno no sólo se ha observado en las raíces medianas, sino igualmente en todo tipo de raíces. Cuanto más delgada es la raíz, mayor es la desproporción entre isorapontina y el glucósido del piceatanol. Debido a que la acción inhibidora de estas sustancias es muy parecida (WENZEL et al.⁽¹⁵⁾), esta variación no debe tener gran influencia en el efecto inhibidor del líber, como se ha visto en la Tabla V (pág. 104).

La combinación en el líber de las raíces de una menor concentración de sustancias inhibidoras por una parte y de un mayor contenido en azúcares por otra, era de esperar que diera lugar a una acción inhibidora más pequeña que la que presenta

el líber del tronco, como así es, en efecto. Las diferencias son sin embargo pequeñas, por lo que se puede tomar indistintamente el valor de la acción inhibidora del líber del tronco o de las raíces para juzgar la del árbol, con la salvedad hecha anteriormente para el caso de suelos abonados con nitrógeno. En la naturaleza, debido a que el líber de las raíces medianas suele ser en general más delgado que el del tronco y además su corteza externa es más fina, la barrera defensiva que oponen a los hongos es, sin duda alguna, más débil, y por ello las raíces de este tamaño son los órganos preferentemente atacados por el parásito.

4.1.2.2 Influencia de la edad de los árboles

Con el fin de estudiar si los árboles a una determinada edad se encuentran especialmente expuestos al ataque de los hongos por contener el líber de sus raíces una menor cantidad de sustancias fungitóxicas, se ha investigado la composición química y el efecto inhibidor del líber de las raíces de abetos rojos de distintas edades situados en la misma estación forestal.

Características de la estación forestal y toma de muestras. Las muestras se tomaron en una plantación de abetos rojos situada en Ebersberger Forst (Distrito Forestal Eglharting, Baviera del Sur). Media anual de precipitaciones: 750 mm; temperatura media anual $7,4^{\circ}\text{C}$; tipo de suelo: tierra parda lixiviada

(sol braun lexivè). Las plantaciones de los árboles de distintas edades se encuentran colindantes.

La toma de muestras de líber se realizó en las raíces medianas de árboles recién talados de 6, 14-16, 24-25 y 104-110 años, y de árboles no talados de 35-40 años, sin signos exteriores de enfermedad, eligiendo 5 árboles de cada grupo de edades y 3 raíces medianas de cada uno.

Fecha de la toma de muestras: 5 de marzo de 1970.

La muestra-mezcla del líber de las raíces pertenecientes a árboles individuales se analizaron por separado. Por ser muy semejantes los resultados obtenidos para árboles de la misma edad, se hallaron los valores medios de las determinaciones correspondientes a cada grupo de edades, que son los que se consignan en la Tabla VI (pág. 109).

Según este experimento, tanto la concentración total de sustancias inhibidoras en el líber y las de los distintos grupos como el efecto inhibidor del mismo no están en relación con la edad de los árboles. Las pequeñas diferencias observadas entre las edades se deben a variaciones entre árboles individuales. HILLIS⁽⁸²⁾ relata resultados semejantes para el contenido en taninos de distintas especies arbóreas.

Desde el punto de vista del contenido del líber de las raíces en sustancias fungitóxicas no existe por tanto una edad privilegiada para la infección del hongo. Teniendo en cuenta sin

T a b l a VI

Influencia de la edad de los árboles sobre la composición química de los extractos y el efecto inhibidor frente al *Fomes annosus* del líber de sus raíces
(5-3-70)

Edad (años)	Extr. de cloroformo sust. resinosas	Polifen. libres	Glucósi- dos	Catequi- nas	Total sustancias inhibidoras	Azúcares	N	Inhibición relativa %/0,5 g del líber seco
6	3,50	1,29	26,75	5,78	37,32	9,52	0,65	28,0
14-16	2,87	0,99	25,28	6,21	35,35	10,94	0,56	26,4
24-25	3,23	1,19	25,90	6,50	36,82	11,05	0,47	26,4
30-40	2,74	1,37	27,58	4,28	35,97	10,46	0,48	28,0
104-110	3,69	0,89	26,08	5,37	36,03	7,23	0,49	26,6

embargo que en árboles jóvenes las raíces principales son de tamaño mediano, la infección de ellas se podrá transmitir más rápidamente al tronco que en árboles de mayor edad.

El estudio de la respuesta del líber al ataque del patógeno en las distintas edades será objeto de otros trabajos dentro del programa.

4.1.2.3 Variación de la composición química de los extractos y del efecto inhibitor del líber frente al Fomes annosus a través del año

De muchas especies arbóreas es conocido el hecho de que la composición química de los extractos de su líber y la concentración de los mismos experimentan una variación a través del año, Así por ejemplo el contenido en taninos del líber de *Tsuga heterophylla* y de *Picea sitchensis* (HILLIS⁽⁸²⁾).

En el caso de *Picea abies* no se habían realizado hasta ahora estudios sistemáticos de este tipo en cuanto a sus constituyentes fenólicos y a su contenido en sustancias extraíbles con cloroformo, solamente ENDRES y MERKLE⁽¹²²⁾ habían observado una variación entre las proporciones relativas de los por ellos llamados monoglucósido y diglucósido del piceatanol en distintas épocas del año.

JUNG⁽⁷³⁾ había investigado la variación que experimenta a través del periodo de actividad vegetativa la toxicidad para

Bacillus subtilis de un extracto del líber del tronco y de las raíces de Picea abies realizado con etanol-agua, encontrando una mayor actividad inhibidora en el verano.

Por lo que se refiere a su contenido en sustancias de reserva, JEREMIAS⁽¹¹⁶⁾ comprueba diferencias considerables en la concentración en azúcares del líber de Picea abies en los distintos meses del año. Todos estos resultados nos movieron a realizar una investigación sistemática de la influencia que un posible cambio en la composición química del líber, en distintas épocas del año, podría tener sobre el efecto inhibidor del mismo frente al Fomes annosus, y por tanto sobre la resistencia -preexistente en el árbol- que puede oponer al hongo.

Características de la estación forestal y toma de muestras. Las experiencias se han realizado con abetos rojos de una plantación en Ebersberger Forst. Las características de esta estación forestal han sido descritas en el apartado 4.1.2.2.

Se eligieron para el experimento 10 árboles de 35-40 años, en apariencia sanos, tomándose de cada árbol una vez al mes, excepto en diciembre, 4 discos de 1,5 cm de diámetro a 1 m de altura, reuniendo los procedentes de los 10 árboles en una muestra común.

El experimento se llevó a cabo entre noviembre de 1968 y octubre de 1969.

Los resultados de los análisis están consignados en la Tabla VII (pág. 112).

T a b l a VII

Variación de la composición química del líber y de su efecto inhibidor frente a Fomes annosus a lo largo del año
(nov. 1968 - oct. 1969)

Mes	Extr. de cloroformo sust. resinosas	Polifen. libres	Glucósi- dos	Catequi- nas	Total sustancias inhibidoras	Azúcares	N	Inhibición relativa %/0,5 g del líber seco
nov.	3,19	1,52	27,50	4,60	36,81	8,25	0,051	40,5
enero	4,05	1,51	29,24	5,20	39,00	11,22	0,075	50,0
febrero	3,85	1,48	25,50	5,00	35,83	10,41	0,080	45,1
marzo	3,42	0,92	25,10	4,80	34,14	9,79	0,074	42,5
abril	3,84	1,42	25,60	4,65	35,47	7,41	0,079	41,4
mayo	3,18	2,40	25,80	5,12	36,50	5,82	0,080	40,5
junio	3,50	1,88	25,80	4,55	34,73	4,80	0,082	38,0
julio	3,80	1,89	27,53	4,60	37,82	5,15	0,087	50,0
agosto	3,27	1,81	26,50	4,80	36,38	6,31	0,087	43,0
setiemb.	3,20	1,41	24,00	4,30	32,91	5,42	0,075	30,0
oct.	3,28	1,51	26,90	4,44	36,13	7,68	0,070	39,5

Tanto la concentración total de sustancias fungitóxicas como la acción inhibidora del líber presentan dos máximos, uno en invierno y otro en verano, que se deben al aumento en la concentración de los glucósidos, ya que la concentración de las sustancias resinosas permanece prácticamente constante, así como la de las catequinas y polifenoles libres. Estos últimos experimentan un crecimiento en el mes de mayo que se mantiene en junio y julio para luego volver a decrecer y permanecer casi constante a lo largo del año. La influencia de esa subida no se deja notar en el efecto inhibidor del líber.

Para una mejor comprensión de los resultados se han representado gráficamente en la Fig. 7 (pág. 114) los valores de la concentración total del líber en sustancias inhibidoras y su concentración en glucósidos (curvas superiores) y de su efecto inhibidor (curva inferior). En las gráficas se observa una correlación entre la concentración total de sustancias inhibidoras en el líber y la acción inhibidora del mismo. Esta correlación es todavía más estrecha si se compara la concentración de glucósidos con el efecto inhibidor.

Desde el punto de vista cualitativo no se ha podido detectar ninguna variación con respecto a las sustancias que aparecen en el cromatograma de la Fig. 1 (pág. 84). Todas se presentan a lo largo del año y en su concentración no se han comprobado cromatográficamente cambios de importancia. Las dos sus

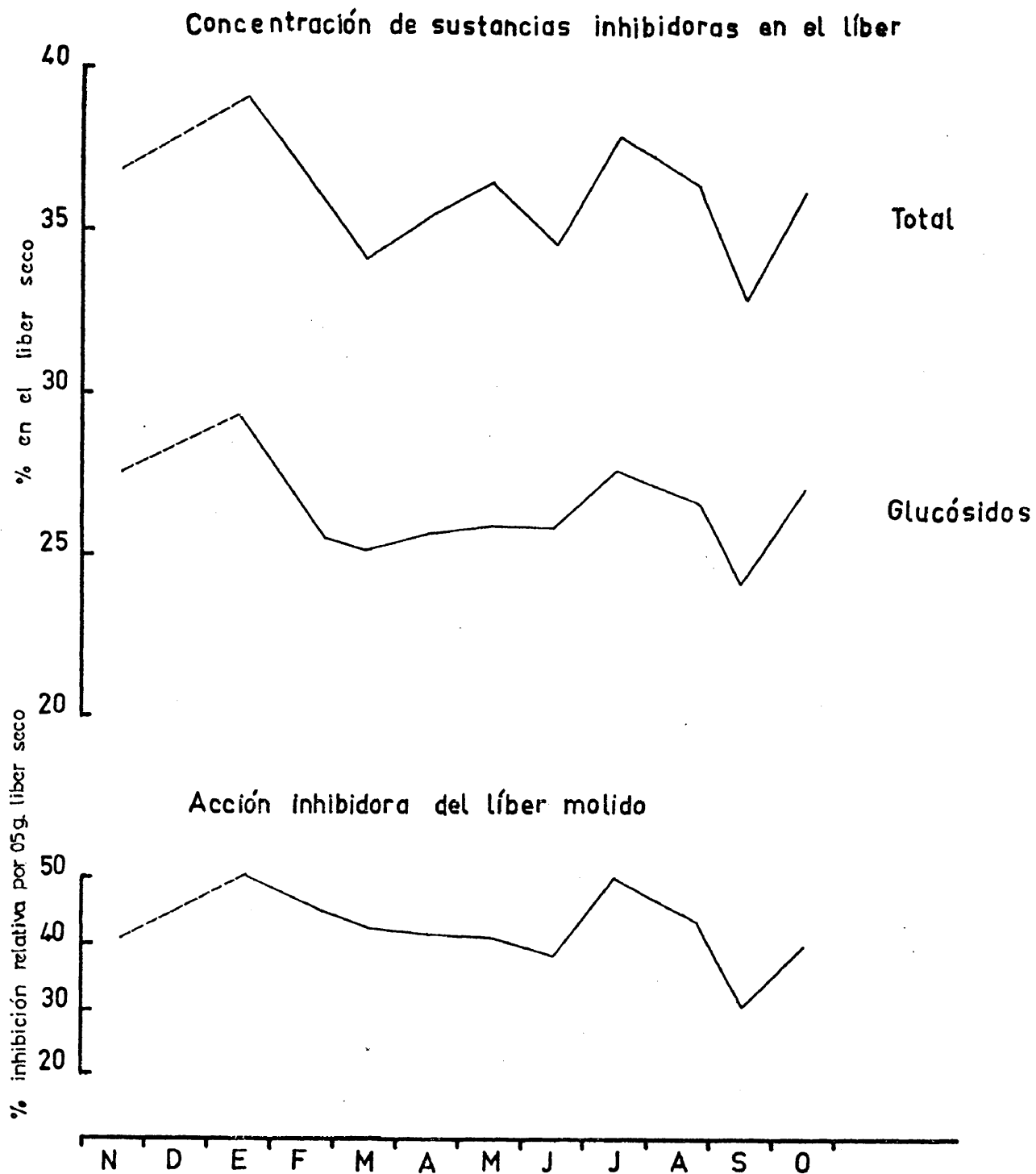


Fig. 7. Variación de la concentración de sustancias inhibitoras y del efecto inhibitor del líber del abeto rojo a lo largo del año.

tancias que aparecen en la mayor concentración, 1 y 2, -que según ENDRES y MERKLE⁽¹²²⁾ correspondían a un diglucósido y a un monoglucósido del piceatanol y que han sido identificadas por AL CUBILLA⁽¹⁴⁾ como un glucósido del piceatanol e isorapontina - han aparecido en los cromatogramas de todos los meses del año. Según ENDRES y MERKLE, la sustancia 1 era el componente principal durante el verano. En los meses inmediatamente anteriores y posteriores coexistía una mezcla del diglucósido y monoglucósido y el resto del tiempo era este último el principal; sin embargo en nuestras investigaciones se ha visto que la proporción entre las sustancias 1 y 2 se mantiene constante a lo largo del año.

En cuanto a la fracción resinosa, por no conocerse sus componentes, se han realizado ensayos biológicos frente al *Formosus annosus* con los extractos obtenidos en los distintos meses, a fin de comprobar si su acción inhibidora experimenta una variación a lo largo del año como consecuencia de posibles cambios en su composición.

Los ensayos se han llevado a cabo a dos concentraciones distintas: 0,1 y 0,25% de la solución de agar-malta. Como valores medios de la inhibición relativa se han obtenido:

Control	0%
0,1%	27%
0,25%	35%

Estos valores permanecen constantes a lo largo del año. Debido a que los componentes de esta fracción son sólo parcialmente solubles en agar-malta, estos ensayos no pueden ser más que orientadores del efecto inhibitor real de estas sustancias sobre el hongo, que en la naturaleza puede ser mayor.

Los azúcares muestran un máximo en invierno y una pequeña subida en julio-agosto para volver a decrecer en setiembre. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por JEREMIAS⁽¹¹⁶⁾. El efecto inhibitor de las sustancias fungitóxicas puede ser debilitado, principalmente en los meses de enero-febrero, debido al influjo de estos compuestos nutritivos para el hongo.

La concentración de nitrógeno soluble en etanol-agua presenta un máximo amplio en los meses de julio-agosto, lo cual podría facilitar en esta época la colonización del líber por los hongos.

A la vista de estos resultados se puede concluir que por lo que se refiere a su contenido en sustancias fungitóxicas los árboles presentan en primavera y en el comienzo del otoño una mayor predisposición a la infección del hongo. A esto se suman otras razones. Así en los meses de invierno, por una parte el árbol se encuentra más rico en sustancias fungitóxicas, pero además las condiciones climatológicas no son apropiadas para la vida del micelio hongo, el cual no puede resistir temperaturas in

feriores a -3°C . Durante el verano, el árbol se protege además mediante la exudación de resina, como se verá en el apartado 4,2, la cual es muy débil en primavera y decrece hacia el otoño.

4.1.3 Relaciones entre el estado de nutrición del abeto rojo y la acción inhibidora de su líber frente a Fomes annosus

Como ya se ha mencionado en la introducción y se ha explicado detalladamente en la parte teórica, la "pudrición del du_uramen" se presenta con una mayor frecuencia en tres tipos de hábitats forestales:

- aquéllos en los que el suelo experimenta sequías periódicas
- los que poseen un suelo con una alta concentración en carbonatos o bien atravesado periódicamente por corrientes de agua bicarbonatada
- los que presentan un suelo muy rico en nitrógeno

Nuestros trabajos estaban orientados a investigar si esas condiciones ecológicas tenían un influjo sobre la composición química del líber y, como consecuencia, sobre su acción inhibidora, predisponiendo así al árbol para el ataque del hongo. Los resultados de los experimentos están expuestos en los apartados siguientes.

4.1.3.1 Influencia de las sequías periódicas del suelo

Los resultados de esta investigación han sido ya dados a conocer por WENZEL y DIAZ-PALACIO⁽¹³⁾.

Características de la estación forestal y toma de muestras. El experimento se realizó en una plantación de abetos rojos en Ebersberger Forst (Baviera del Sur). Las características de esta estación forestal han sido descritas en el apartado 4.1.2.2. La plantación no había sido nunca raleada y el terreno es llano. La edad de los árboles estaba comprendida entre 30-40 años.

Se eligieron dos parcelas de 12 x 12 m, una de las cuales fue cubierta con lámina de polietileno de 0,2 mm de espesor para conseguir una sequía artificial del suelo, y la otra sirvió como control. De cada una de ellas se escogieron 4 árboles del mismo diámetro situados en el centro. Las muestras se tomaron a 1 m de altura.

Para poder medir el contenido en agua del suelo con una sonda neutrónica (*), se proveyó cada parcela de un tubo de medida que se introdujo hasta 1 m de profundidad. Con la sonda sólo se pudieron obtener en este caso valores relativos, porque un calibrado era extraordinariamente difícil a causa de ser un suelo muy pedregoso.

(*) Estas medidas fueron realizadas por el Dr. G. Wenzel.

El experimento se comenzó el 14 de mayo de 1969, fecha en que se tomaron las primeras muestras del líber y se realizaron las medidas iniciales con la sonda neutrónica, y se dio por terminado el 21 de noviembre del mismo año. Las sucesivas tomas de muestras se llevaron a cabo con una distancia aproximada de un mes. Solamente en el mes de julio se hicieron dos tomas. El último día se tomaron también muestras de acículas de los árboles investigados.

Variación del contenido en agua del suelo en la parcela cubierta y en la parcela control.

El proceso de variación del contenido en agua del suelo en ambas parcelas se ha seguido a través de medidas realizadas con una sonda neutrónica y mediante cálculos teóricos.

Las medidas llevadas a cabo con la sonda neutrónica dieron como resultado que en la parcela cubierta el contenido en agua de aquella parte del suelo donde se encontraban la mayoría de las raíces (aproximadamente hasta 80 cm de profundidad) había descendido al cabo de 60 días a un 68% del inicial, y a final de octubre a un 60%.

En la parcela control el contenido en agua a los 60 días de haberse iniciado el experimento, era casi igual a la "capacidad de almacenaje de agua" del suelo. (Estos resultados se habían encontrado ya en un ensayo previo realizado en los meses

de julio-octubre de 1968). A finales de octubre su contenido en agua era sin embargo igual al de la parcela cubierta, lo cual es comprensible al considerar las escasas precipitaciones de setiembre (13,3 mm) y octubre (1,5 mm).

Para comprobar si el abastecimiento de agua hacia el final del experimento en ambas parcelas no era suficiente para una producción normal de sustancias inhibidoras -suponiendo con LAATSCH⁽¹¹³⁾ que la fotosíntesis se ve reducida en cuanto el contenido del suelo en agua utilizable está por debajo de $1/2$ de la capacidad de almacenaje de agua utilizable- se realizaron cálculos teóricos de esta capacidad, siguiendo el método descrito por LAATSCH⁽¹¹³⁾ para suelos fácilmente permeables.

Debido a que el suelo de nuestras parcelas es muy pedregoso entra dentro del grupo de los suelos fácilmente permeables a pesar de tratarse de una tierra parda lixiviada.

El cálculo del contenido en agua del suelo según este método consiste simplemente en la adición del balance climático del agua al valor de la "capacidad de almacenaje de agua utilizable", que se estima según las características del suelo de que se trate. Se supone que al comienzo del periodo de actividad vegetativa la "capacidad de almacenaje de agua" del suelo está colmada.

El balance climático del agua se define como la diferencia entre precipitaciones y evaporación. Estos balances se sue-

len hacer por décadas. Si su valor es positivo elevan el contenido en agua del suelo hasta alcanzar la capacidad de almacenaje, y el resto se considera agua de percolación. Los balances negativos se sustraen del contenido en agua hasta que se alcanza el punto de marchitez permanente al terminarse el agua utilizable por las plantas.

Los cálculos teóricos del contenido en agua del suelo se realizaron a partir del 1 de abril de 1969. Como valor inicial del contenido en agua en ese día se tomó la "capacidad de almacenaje", ya que el invierno anterior había habido precipitaciones abundantes. Esta "capacidad de almacenaje" así como la "capacidad de almacenaje de agua utilizable" y la "capacidad de almacenaje de agua fácilmente utilizable" fueron estimadas a partir del perfil del suelo de nuestras parcelas, según los datos de SCHLICHTING y BLUME⁽¹²³⁾, obteniendo unos valores de 241,129 y 64,5 mm respectivamente. La descripción detallada de esta estimación se encuentra en WENZEL y DIAZ-PALACIO⁽¹³⁾.

Con estos datos como base y las tablas de THORNWAITE y MATHER⁽¹¹⁵⁾ se puede calcular la variación del agua utilizable y de la fácilmente utilizable (Tabla VIII, pág. 122). Las variables utilizadas en esta Tabla se encuentran en la pág. 123.

T a b l a VIII

Cálculo de la cantidad de agua fácilmente utilizable por las plantas en el suelo de la parcela control, según LAATSCH⁽¹¹³⁾. (Ebersberger Forst, 1969)

Capacidad de almacenaje de agua utilizable = 129 mm

Capacidad de almacenaje de agua fácilmente utilizable = 64,5 mm

	T	i	E ₁	s	E ₂	P	E _{1d}	P-E _{1d}	agua utilizable	agua fácilmente utilizable	agua de percolación
enero	-0,44	0,0	0,0	22,8	0						
feb.	-1,4	0,0	0,0	23,7	0						
marzo	2,6	0,37	0,5	30,6	15,3						
abr.	7,4	1,81	1,3	34,2	44	4,1 36,9 9,5	14 15 15	- 9,9 21,9 - 4,5	119,1 129 124,5	54,6 64,5 60	12
mayo	13,6	4,55	2,3	39,3	90	24,8 34,1 29,2	30 30 30	- 5,2 4,1 - 0,8	119,3 123,4 122,6	54,8 58,9 58,1	
junio	13,4	4,45	2,3	39,9	92	83,2 19,4 31,5	30 31 31	53,2 -11,6 0,5	129 117,4 117,9	64,5 52,9 53,4	46,8
julio	17,9	6,9	3,1	40,2	125	66 34,7 0,3	42 42 41	24 - 7,3 -40,7	129 121,7 81,0	64,5 57,2 16,5	12,9
ago.	15,9	5,76	2,8	36,9	103	14,9 41,8 64,7	34 34 35	-19,1 7,8 29,7	61,9 69,7 99,4	- 2,6 5,2 34,9	
sept.	14,1	4,81	2,4	31,5	76	6,3 7,0 0,0	25 25 26	-19,7 -18 -26	79,7 61,7 35,7	15,2 - 2,8 -28,8	
oct.	8,6	2,27	1,5	27,9	42	0,7 0,6 1,2	14 14 14	-13,3 -13,4 -12,8	22,4 9 0(*)	-42,1 -55,5 -64,5(**)	
nov.	2,3	0,31	0,4	23,1	9,34	18,1 36,5 21,9	3,1 3,1 3,1	12,9 33,4 18,8	12,9 46,3 65,1	-51,6 -18,2 0,6	
dic.	-5,1	0,0	0,0	21,6	0,0	20,8 31,1 9,3	0,0 0,0 0,0	20,8 31,1 9,3	85,9 117,0 126,9	21,4 52,5 61,8	

*) A partir de este valor las plantas ya no disponen de agua utilizable, al haberse agotado el contenido en agua fácil y difícilmente utilizable (**).

Variables utilizadas en la Tabla VIII

- T (*) = temperatura media mensual
- i = factor en conexión con la temperatura (se calcula a partir de las tablas de THORNWAITE y MATHER⁽¹¹⁵⁾)
- E₁ = evapotranspiración potencial mensual, obtenida a partir de las tablas de THORNWAITE y MATHER⁽¹¹⁵⁾
- s = duración media de la luz solar para Munich (48° de latitud norte) en unidades de 12 horas, obtenida a partir de las tablas de THORNWAITE y MATHER⁽¹¹⁵⁾
- E₂ = evapotranspiración potencial mensual con la corrección debida al factor s
- $$E_2 = E_1 \times s$$
- P (*) = precipitaciones por década del mes
- E_{2d} = evapotranspiración potencial por década del mes
- P-E_{2d} = balance climático del agua por década del mes

(*) Los datos correspondientes a la temperatura y a las precipitaciones fueron proporcionados por Dr. Baumgartner, del Instituto de Meteorología de Munich, a quien deseamos expresar nuestro agradecimiento.

En la Fig. 8 (pág. 125) están representados los valores calculados para el agua fácilmente utilizable en la parcela control (línea continua) y en la parcela cubierta (línea de puntos).

Los puntos señalados en la gráfica como SN_1 y SN_2 corresponden a las medidas realizadas con la sonda neutrónica en la parcela control y en la cubierta respectivamente. Debido a que la sonda no proporciona, en nuestro caso, valores absolutos, como ya se ha mencionado, se le asignó como valor inicial correspondiente a las medidas realizadas con ella en la fecha de comienzo del experimento (14-5-69) el obtenido mediante cálculos teóricos para el contenido del suelo en agua utilizable para ese día.

Según los valores calculados, los árboles de la parcela control sufren durante algunos días de agosto y desde el 20 de setiembre hasta primeros de diciembre falta de agua. Si comparamos el valor medio y el calculado vemos que en julio ambos prácticamente coinciden y en octubre el primero sólo se encuentra 8,5% más alto que el calculado, lo que da una buena correspondencia entre medición y cálculo.

La línea de puntos obtenida para la parcela cubierta, realizando los cálculos bajo el supuesto de que la lámina de polietileno no deja atravesar el agua, ($P = 0$), no guarda relación con los valores medidos con la sonda neutrónica (SN_2) tan-

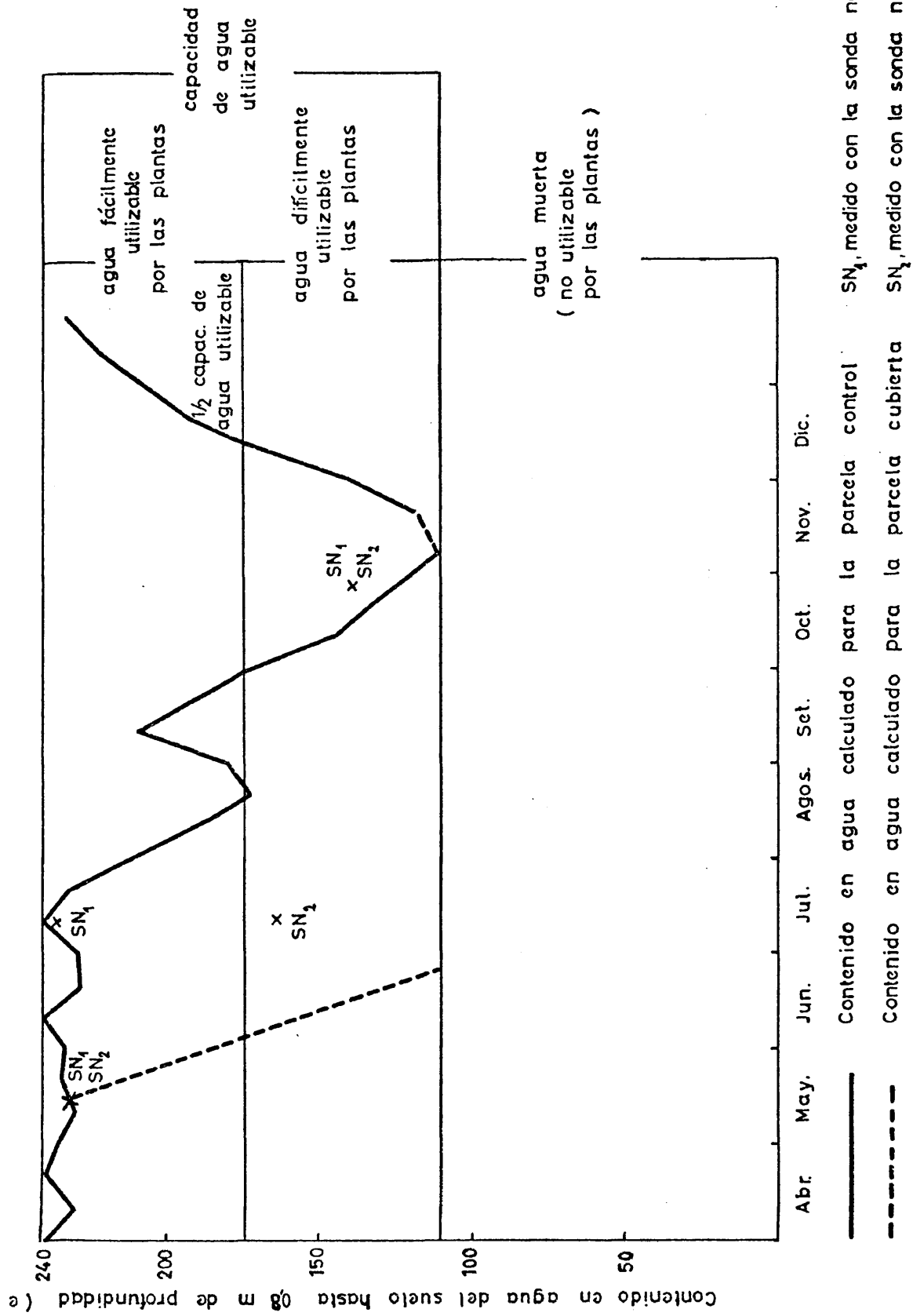


Fig. 8. Variación del contenido en agua del suelo de la parcela control y de la cubierta.
(Ebersberger Forst, 1969)

to en julio como en octubre. Esto se debe probablemente, por una parte, a que la evaporación del suelo se ve reducida debido a la lámina de plástico y, por otra, a una posible entrada de agua desde la región del suelo que rodea la lámina. El valor NS_2 de julio nos indica, sin embargo, que para esas fechas los árboles ya no disponen de agua fácilmente utilizable, por lo que su síntesis se habrá visto reducida.

Influencia del abastecimiento de agua en la composición química y en la acción inhibidora del líber. La Fig. 9 (pág.127) muestra la influencia del abastecimiento de agua del suelo en la concentración total de sustancias inhibidoras y en el efecto inhibidor del líber.

Al principio del experimento el valor de la concentración de sustancias inhibidoras en los árboles de la parcela cubierta es mayor que en los de la parcela control. Al cabo de 60 días, aproximadamente, la concentración de los árboles de la parcela control ha sobrepasado la de los primeros en un 12%. Hasta la mitad de setiembre las diferencias entre los valores de ambas parcelas están asegurados estadísticamente ($P = 5\%$). A partir de esta fecha las diferencias ya no son significantes, lo cual es comprensible al considerar la falta de agua que sufren ambas parcelas en el último periodo. Sería sin embargo de esperar que los valores de la concentración de las sustancias inhi-

Concentración de sustancias inhibidoras en el líber

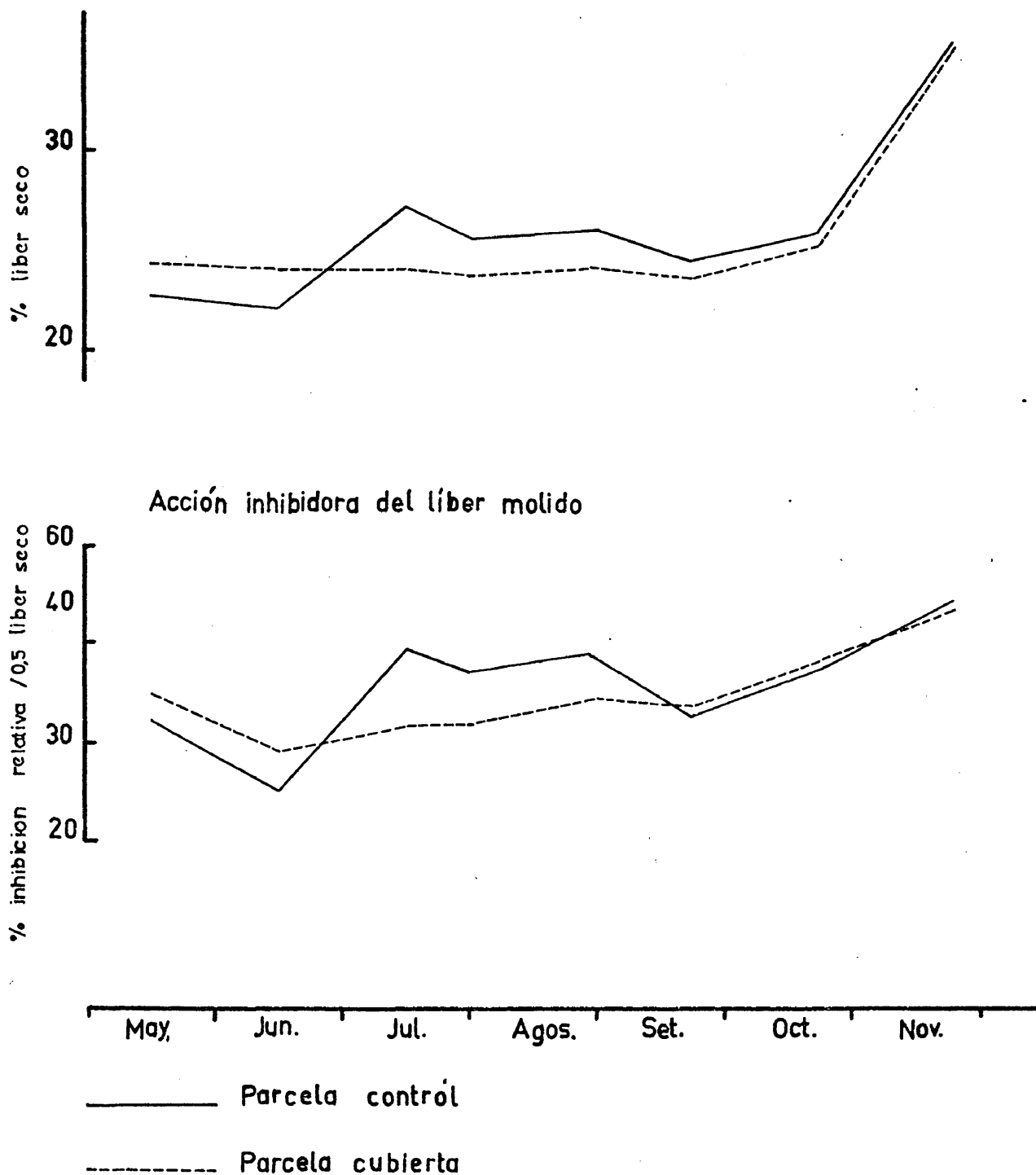


Fig. 9. Variación de la concentración total de sustancias inhibidoras en la parcela control y en la cubierta a lo largo del Experimento (Ebersberger Forst 1969)

bidoras bajaran en vez de subir. La subida a partir de octubre es característica de esta época del año, como hemos visto en el apartado 4.1.2.3. El mínimo de setiembre es menos pronunciado en estos árboles que en los que sirvieron para el experimento del apartado acabado de mencionar, lo cual puede ser debido a la fecha de la toma de muestras, ya que la subida observada en octubre puede empezar a últimos de setiembre.

La acción inhibidora del líber frente a *Fomes annosus* (curva inferior de la Fig. 9, pág. 127), como se puede apreciar, está en estrecha correlación con la cantidad de sustancias fungitóxicas.

La variación de la concentración total de azúcares de am bas parcelas está representada en la Fig.10 (pág. 129). Los árboles de la parcela cubierta muestran un mínimo a principios de julio, probablemente como consecuencia de una reducción de la fo tosíntesis debido a la falta de agua -que se corresponde con la fuerte reducción de los fenoles- y luego experimentan un crecimiento mayor que los de la parcela control, no presentando el pe queño mínimo que éstos muestran en setiembre. Esta mayor con cen tración de azúcares en el líber de los árboles bajo condiciones de sequedad en comparación con la de árboles con suficiente a- bastecimiento de agua se ha encontrado también en otros casos , por ejemplo en *Pinus taeda* (HODGES y LORIO⁽¹²⁴⁾) y es atribuida por estos autores a una reducción del crecimiento en los árbo-

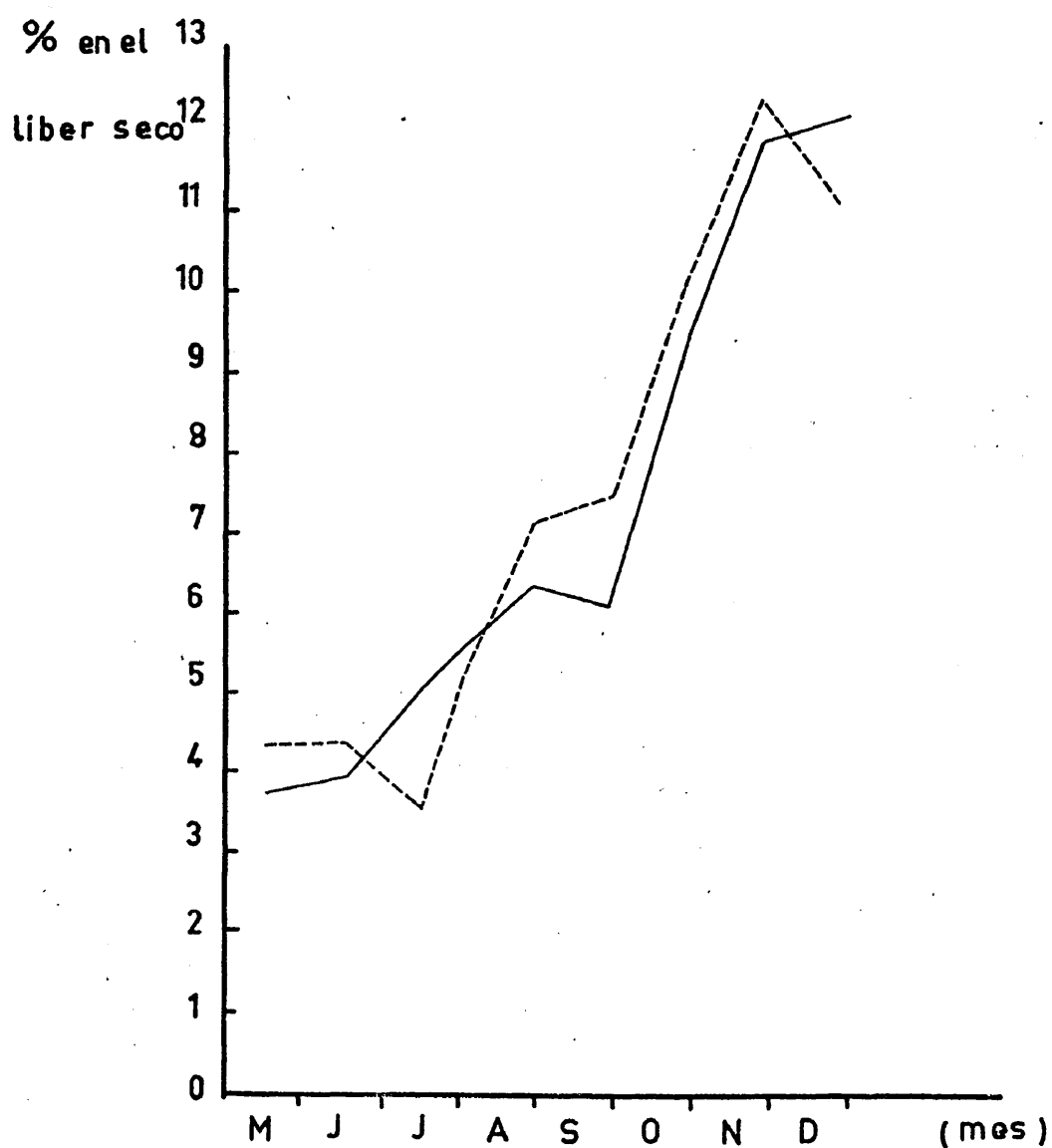


Fig. 10. Variación de la concentración total de azúcares en la parcela control y en la cubierta a lo largo del experimento (Ebersberger Forst 1969)

les. Según ellos el azúcar procedente de la hidrólisis del almidón es utilizado por los árboles en condiciones normales para el crecimiento de las células, mientras que en los árboles sometidos a sequedad se queda acumulado.

No todos los azúcares siguen el mismo ritmo. Según estos mismos autores el azúcar de transporte, es decir, la sacarosa, experimenta durante algún tiempo una disminución en su concentración, como consecuencia probablemente de una reducción de la fotosíntesis. Esto podría ser una causa de la menor concentración de fenoles en el líber de los árboles de la parcela cubierta, ya que este azúcar está en estrecha relación con la síntesis de fenoles (DITTRICH⁽¹⁷⁾).

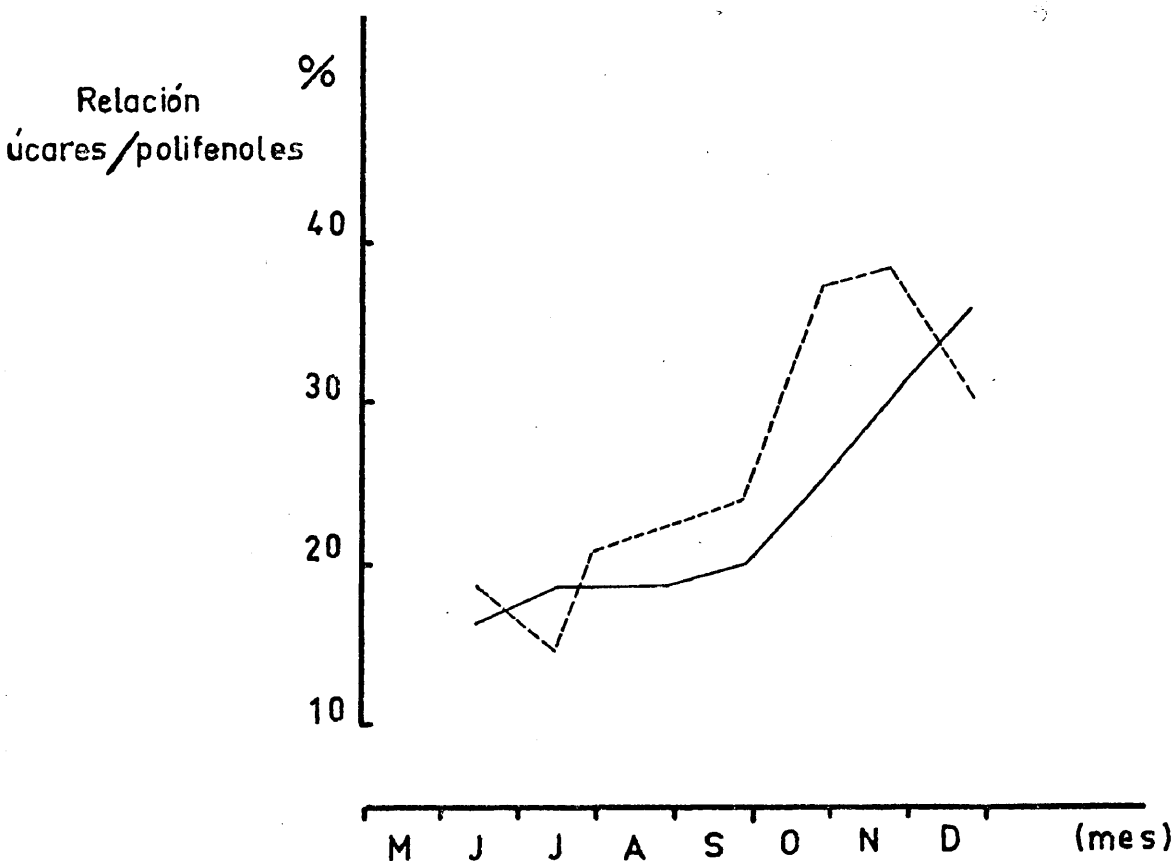


Fig. 11. Relación azúcares/polifenoles expresada en % en la parcela control (—) y en la cubierta (----) a lo largo del experimento

Como consecuencia de esa acumulación de azúcares, la relación azúcares/polifenoles es diferente para ambas parcelas. En la Fig. 11 (pág. 130) está representada esta variación a lo largo del experimento. En los árboles de la parcela cubierta, la relación azúcares/polifenoles es mayor que la de los árboles control, al principio del experimento; sufre luego una fuerte de presión en julio para después crecer mucho más rápidamente que en los árboles control. Las pruebas tomadas en diciembre, un mes después de haber quitado la cubierta, muestran una relación inversa. Esta mayor proporción relativa de azúcares en el líber de árboles con falta de agua puede proporcionar a los hongos un mejor sustrato nutritivo.

VAADIA et al.⁽⁹⁰⁾ encuentran que la falta de agua dificulta además la absorción de potasio por las raíces, lo cual puede conducir igualmente a una disminución de la fotosíntesis. Los análisis de las acículas (Tabla IX, pág. 132) muestran que la concentración de este elemento en las acículas procedentes de los árboles de la parcela cubierta es claramente más bajo que la de los árboles de la parcela tomada como control.

Los elementos Ca y Mg se comportan al contrario que el K. En el caso de estos elementos el aumento de concentración en la parcela cubierta puede ser debido a que las acículas de ésta son algo más pequeñas. También se puede atribuir al antagonismo entre elementos monovalentes y divalentes.

T a b l a IX

Concentración de elementos nutritivos en las acículas
de Picea abies (21-11-69)

Parcela	Peso de 100 acículas g	% en sustancia seca				
		N	P	K	Ca	Mg
Control	1,1130	1,11	0,13	0,68	0,36	0,094
Cubierta	0,8961	1,11	0,13	0,46	0,46	0,118

Como resumen de esta investigación se puede concluir que la sequía del suelo disminuye la concentración de sustancias fungitóxicas en el líber del abeto rojo y la acción inhibidora del mismo. En las temporadas en que el abastecimiento de agua es escaso, estarán pues los árboles especialmente predispuestos a la penetración de los hongos, lo cual puede ser uno de los motivos de la mayor frecuencia con que aparece la "pudrición del duramen" en los hábitats forestales que sufren sequías periódicas.

4.1.3.2 Influencia de un suelo rico en carbonatos

El segundo tipo de hábitats forestales a investigar en los que se presenta con frecuencia la "pudrición del duramen" era el de aquellos que poseen un suelo rico en carbonatos, los

que dan lugar a un pH neutro o básico, según los casos, poco apropiado para el crecimiento de los abetos rojos. En estos suelos presentan los árboles frecuentemente una deficiencia en microelementos, principalmente, como ya se dijo en el apartado 2.4.2, en manganeso. Por ello se juzgó interesante estudiar el influjo que la deficiencia de este elemento podía ejercer sobre la composición química de los extractos del líber de los abetos rojos y la acción inhibidora del mismo.

Influencia de la deficiencia de los abetos rojos en manganeso sobre la acción inhibidora del líber

Para llevar a cabo estos experimentos se han tomado pruebas en dos estaciones forestales (*) de Baviera del Sur: Feldmoching y Günzburg. En ambos casos se trata de suelos turbosos a los que parcialmente se les había privado de la turba en la parte superior. Los árboles que crecen precisamente en esos sitios extienden sus raíces en horizontes calizos, mientras que a pocos metros crecen árboles sobre suelo ácido.

Feldmoching: Media anual de precipitaciones: 800 mm; temperatura media anual 7,5°C. Edad de los árboles: 12 años.

Günzburg: Media anual de precipitaciones: 650 mm; tempe

(*) Los datos referentes a las estaciones forestales han sido tomados de WENZEL y KREUTZER⁽¹⁶⁾.

ratura media anual $7,5^{\circ}\text{C}$. Edad de los árboles: 10 y 17 años.

En cada estación forestal de las anteriores se eligie - ron dos plantaciones colindantes de abetos rojos, una de árboles con un abastecimiento de manganeso suficiente -en suelo áci do- y otra de árboles con una gran deficiencia en este elemento que crecían en los suelos que habían sido privados del horizon- te superior ácido, con un pH entre neutro y débilmente alcalino. A pesar de que los árboles de ambas plantaciones dentro de cada estación forestal tenían la misma edad e idéntico abastecimien- to de agua -suficiente para un buen crecimiento- presentaban grandes diferencias en cuanto a altura y aspecto exterior (Fig.12)



Fig. 12. Plantación de abetos rojos en Günzburg. Arbo- les de igual edad (17 años) con suficiente mangane- so en las acículas (verdes) y con deficiencia en manganeso (amarillas)

KREUTZER⁽⁹⁴⁾ ha realizado análisis de las acículas de ambas estaciones forestales encontrando concentraciones entre 80 y 100 ppm de manganeso para los árboles sanos y entre 3 y 8 ppm en los enfermos. Las acículas de estos últimos presentan además síntomas claros de deficiencia en este elemento, que desaparecen al ser tratadas con una sal de este manganeso, sumergiendo las ramas en una solución de $Mn(NO_3)_2$ o de $Na_2Mn.EDTA$ (KREUTZER⁽¹²⁴⁾). El resto de los elementos nutritivos está presente en una concentración suficiente para un crecimiento normal. En cada plantación se eligieron 10 árboles tomándose 4 muestras ($\phi = 1,5$ cm) de líber de cada uno y reuniéndose las de cada plantación en una muestra común.

Las características de cada toma así como los resultados de los análisis químicos y los ensayos biológicos con *Fomes annosus* están consignados en la Tabla X (pág. 136).

Los experimentos se han agrupado según la edad de los árboles y la altura de los mismos. En el primer grupo de comparaciones (comparación 1 y 2) se han examinado árboles de igual edad pero de distinta altura debido a su crecimiento anormal por la falta de manganeso. Las primeras muestras se tomaron a 1 m de altura sobre el suelo, pero al ser extraordinariamente delgado a esta altura el líber de los árboles con falta de manganeso, lo que hacía difícil su separación, se optó por tomar las muestras a 0,2 m.

aparato
nº

Edad (años) Altura (m) Posición de las muestras Fecha Extracto de cloroformo sustancias resinosas Polifenoles libres Glucósidos Catequinas Azúcares

% del líber seco

	a)	b)	c)	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)	a)	b)
1	17	17	9	2,5	1	1	31.7.68	3,85	4,00	1,76	0,85	21,73	14,50	4,55	2,50	6,83	6,35
2	17	17	9	2,5	0,2	0,2	3.2.69	4,29	5,00	1,40	1,00	24,00	16,79	3,90	2,40	10,23	8,44
3	10	17	2,5	2,5	0,2	0,2	17.9.68	9,01	14,30	1,76	0,90	22,63	10,78	4,55	2,10	6,83	6,00
4	10	17	2,5	2,5	0,2	0,2	3.2.69	7,13	5,00	1,40	1,00	24,58	16,79	4,50	2,40	11,41	8,44
5	12	12	4,5	2	0,2	0,2	2.2.69	5,73	6,03	1,20	1,02	23,50	20,00	3,80	3,55	7,22	6,73

En el segundo grupo (comparaciones 3 y 4) se han comparado árboles de igual altura pero de distinta edad, situados también en plantaciones colindantes. Los sanos tenían 10 años y los enfermos 17, y ambas plantaciones presentaban una altura de 2,5 m. El último grupo de pruebas se tomó en Feldmoching. En esta estación forestal las diferencias entre los árboles con deficiencia en manganeso y los que poseen un buen abastecimiento del mismo no son tan marcadas como en Günzburg.

En todos los casos examinados los valores de la acción inhibidora del líber (columna 12) correspondientes a los árboles sanos son mayores que los de los árboles con deficiencia en manganeso. Estos valores se corresponden con una menor concentración total de sustancias inhibidoras (columna 11) en el líber de los árboles sanos respecto a la de los enfermos. Particularmente notable es la pequeña cantidad de glucósidos de los árboles enfermos en Grünzburg (columna 8).

En la comparación 3 la gran concentración de sustancias resinosas que presentan ambas plantaciones en setiembre (columna 6) sólo se ha encontrado en este caso.

Se puede concluir pues, como resultados de estos experimentos, que la deficiencia en manganeso de los abetos rojos da lugar a una concentración menor de sustancias fungitóxicas en el líber y, como consecuencia, a una acción inhibidora del mismo más pequeña. Esta sería pues una de las causas que contribuyera

a la mayor frecuencia con que árboles que crecen en suelos alcalinos son atacados por la "pudrición del duramen".

En estos suelos además, no sólo la resistencia del líber preexistente a la infección se ve influenciada por la insuficiente nutrición de los árboles en manganeso, sino también la exudación de resina, como se verá en el apartado 4.2.3, la cual es mucho menor en estos árboles que en los sanos.

Junto a estas razones, que se refieren a la predisposición de la planta, hay que considerar en este tipo de hábitats forestales otra también muy importante con relación a la vida del *Fomes annosus*. Los antagonistas de este hongo, principalmente *Trichoderma viridi*, no encuentran en los suelos calizos, a causa de su elevado pH unas condiciones de vida apropiadas, por lo que el parásito causante de la pudrición puede crecer y reproducirse con mayor facilidad (RISBETH⁽¹²⁵⁾, BRAUN⁽²⁶⁾).

Desde ambos puntos de vista -predisposición de los árboles a la infección a causa de una menor concentración en sustancias fungitóxicas por una parte y la facilidad para la vida del *Fomes annosus* por otra- los hábitats forestales en los que los árboles vayan a estar sometidos a una deficiencia en manganeso no son apropiados para abetos rojos.

4.1.3.3 Influencia de un suelo muy rico en nitrógeno

El tercer tipo de hábitats forestales especialmente pre^u dispuestos a la pudrición del duramen es el de los que poseen un suelo muy rico en nitrógeno. Tales suelos pueden existir en la naturaleza (p.ej., tierra parda sobre basalto) o ser el resulta^u do de un abonado con grandes cantidades de este elemento.

Realización del experimento. Para investigar el influjo que un abonado excesivo, exclusivamente a base de nitrógeno, pue^u de ejercer sobre la composición química de los extractos del lí^u ber del abeto rojo y sobre el efecto inhibidor del mismo, se eli^u gió una plantación de abetos rojos en Ebersberger Forst. Las ca^u racterísticas de esta estación forestal han sido ya descritas en el apartado 4.1.2.3. Los árboles tenían entre 30 y 40 años y aspecto sano.

Dentro de la plantación se reservaron dos parcelas de 30 x 30 m para el abonado (N_1 y N_2) y otras dos de igual superficie sirvieron como control (C_1 y C_2). Cada una estaba separada de la colindante por una distancia de 5 m para evitar influen^u cias mutuas. De cada parcela se eligieron 10 árboles aproximada^u mente del mismo diámetro, de donde se tomaron las muestras a lo largo de todo el experimento.

Fecha de comienzo: 17 abril 1968.

En este día se tomaron muestras de líber del tronco a 1 m de altura en las cuatro parcelas. En la Tabla XI (pág. 140)

T a b l a X I

Análisis del líber del tronco

(17-4-68)

Parcelas		Conc. total de sust. inhibidoras % del líber seco	Inhibición relativa % / 0,5 g del líber seco
reservadas para el abonado	N ₁	30,50	30,0
	N ₂	32,50	31,0
reservadas como control	C ₁	29,40	29,0
	C ₂	25,00	20,0

se han registrado los valores obtenidos para la concentración total de sustancias inhibidoras y para el efecto inhibidor del líber molido sobre el *Fomes annosus*, en los análisis realizados con estas muestras.

Los valores de la Tabla XI muestran una clara correlación entre el contenido total en sustancias fungitóxicas del líber y su efecto inhibidor en las cuatro parcelas. La acción inhibidora de la parcela control C₂ es algo más pequeña, correspondiendo a su contenido, también menor, de sustancias fungitó-

xicas.

En mayo de ese mismo año se abonaron las dos parcelas reservadas para el efecto con un abono nitrogenado compuesto por un 67% de nitrato amónico y un 33% de carbonato cálcico, en dos abonados de 256 Kg N/ha cada uno, el primero el 9 y el segundo el 28 de mayo.

El efecto de este abonado en la concentración de nitrógeno de los árboles se comprobó mediante el análisis de acículas, cuyas muestras se tomaron en noviembre del mismo año. La concentración de nitrógeno en las acículas está consignada en la Tabla XII. El resto de los elementos no presentó diferencias dignas de mención.

T a b l a X I I

Concentración de nitrógeno en las acículas
(21-11-68)

		<u>% N en la sustancia seca</u>
parcelas abonadas	N ₁	1,69
	N ₂	1,54
parcelas control	C ₁	1,18
	C ₂	1,18

A pesar de esta clara subida de la concentración de nitrógeno en las acículas, el efecto inhibidor del líber del tronco y la composición química de sus extractos no habían experimentado ninguna variación, como mostraban los análisis de las muestras tomadas con regularidad una vez al mes a partir de mayo, y la siguieron sin presentar durante todo el invierno 68-69.

Durante el periodo de actividad vegetativa de 1969 se volvió a repetir el abonado con la misma cantidad total que el año anterior pero dividido en tres veces: 128 Kg N/ha el 28 de abril, y el 12 de junio, y 256 Kg N/ha el 1 de setiembre, pero no se experimentó tampoco ninguna variación en la composición química de los extractos del líber del tronco y en el efecto inhibidor del mismo líber sobre el Fomes annosus. Los análisis de las acículas tomadas el 19 de noviembre del mismo año muestran un nuevo aumento de la concentración de nitrógeno, como se verá en la Tabla XIII (pág. 143), por lo que indudablemente los árboles habían asimilado una gran parte del nitrógeno ofrecido.

El líber del tronco a la altura de 1 m y el de las raíces medianas suelen presentar en general un efecto inhibidor semejante, como ya se ha mencionado en el apartado 4.1.2.1; sin embargo, debido a que el líber del tronco no mostraba ninguna variación, tanto en la composición química de sus extractos como en su acción inhibidora, se pensó finalmente en tomar muestras del líber de las raíces de las cuatro parcelas para examinar su

efecto inhibitor y ver si en ellas la concentración en nitrógeno había experimentado mayor variación.

La primera toma de muestras de raíces se realizó el 21 de abril de 1970, en cuanto desapareció la nieve. De los mismos árboles y en esa misma fecha se tomaron muestras del líber del tronco a 1 m de altura. Los valores para la concentración de nitrógeno en las acículas, líber de las raíces y líber del tronco en las parcelas abonadas y en las tomadas como control están expuestos en la Tabla XIII

T a b l a X I I I

Concentración de nitrógeno en las acículas, líber de las raíces y líber del tronco en las parcelas abonadas y en las control

		Acículas 19-11-69	Líber raíces medianas 21-4-70	Líber tronco 21-4-70
		% N en la sustancia seca		
parcelas abonadas	N ₁	1,92	1,15	0,56
	N ₂	1,65	0,91	0,51
parcelas control	C ₁	1,18	0,50	0,46
	C ₂	1,17	0,43	0,43

Del examen de estos resultados se deduce que el contenido en nitrógeno del líber de las raíces en las parcelas abonadas ha aumentado en una proporción mucho mayor que el del líber del tronco de esos mismos árboles. Esto último hace comprensible que el efecto inhibidor del líber del tronco no presentara variaciones entre las parcelas. Los resultados de los ensayos biológicos con el líber de ambos (raíces y tronco) están consignados en la Tabla XIV

T a b l a X I V

Comparación de la acción inhibidora del líber de las raíces
con la del líber del tronco a 1 m

(21-4-70)

		Inhibición relativa % / 0,5 g de líber seco	
		Raíces	Tronco
parcelas abonadas	N ₁	2	31,4
	N ₂	7	30
parcelas control	C ₁	28,2	29
	C ₂	19,5	22,5

Los valores de inhibición que presenta el líber del tronco de las 4 parcelas son muy semejantes a los obtenidos para este mes en 1968 (comparar con la Tabla XI, pág. 140). Se observa también una buena correlación entre raíces y tronco de las parcelas control. Por el contrario las raíces de las parcelas abonadas con nitrógeno muestran una acción inhibidora extraordinariamente pequeña, sobre todo N_1 , que es según la Tabla XIII (pág. 143) la que ha experimentado la mayor subida en la concentración de nitrógeno. Es posible que esta disminución de la acción inhibidora del líber de las raíces haya sido un proceso paulatino que la falta de muestras de raíces en este tiempo intermedio nos ha impedido comprobar.

Causas de la reducción de la acción inhibidora en las raíces de las parcelas abonadas

Las causas de esta reducción en la acción inhibidora del líber de las raíces pueden ser entre otras:

- Una concentración más pequeña de sustancias inhibidoras.
- Una mayor proporción de sustancias nutritivas para el hongo, que favorecieran su crecimiento.
- Una combinación de las dos anteriores.

A fin de examinar cuál de estas causas jugaba en nuestro caso un papel importante, se realizaron análisis químicos de los extractos de líber de las cuatro parcelas, cuyos resultados están expuestos en la Tabla XV (pág. 146) correspondiente

T a b l a XV

Composición química de los extractos y acción inhibidora del líber de las raíces de abetos
rojos abonados con nitrógeno y de los tomados como control
(16-4-70)

Parcelas	Extr. de cloroformo sust. resinosas	Polifen. libres	Glucósi- dos	Catequi- nas	Total sustancias inhibidoras	Azúcares	Almidón	Total		
								aminoácidos libres	Inhib. relativa	
								mol/100g del líber seco	%/0,5g del líber seco	
abon.	N ₁	2,56	1,28	23,22	4,72	31,78	6,60	1,70	2752,43	2
	N ₂	2,18	1,40	25,60	4,50	33,68	6,09	2,46	2682,32	7
cont.	C ₁	2,32	1,37	23,00	4,28	30,97	6,10	2,30	369,44	28,2
	C ₂	2,74	0,92	20,50	4,24	28,40	6,50	1,35	368,63	19,5

al mes de abril. Además de los grupos de sustancias comunmente analizados, se ha añadido la concentración de almidón y el total de aminoácidos libres expresado en mol por 100 g de líber seco.

Como se puede observar, el abonado con nitrógeno no ha influido en la concentración de sustancias fungitóxicas del líber, ni en la total, ni en los distintos grupos. Tampoco se deja notar su influencia en la concentración de azúcares ni en la de almidón. La concentración de aminoácidos libres, por el contrario, es alrededor de 7 veces mayor en las parcelas abonadas.

No sólo los aminoácidos libres han sufrido un incremento, sino también otros compuestos nitrogenados solubles en etanol-agua, como se puede deducir de los datos expuestos en la Tabla XVI (pág. 148).

Sometiendo a hidrólisis el extracto de etanol-agua y analizando los aminoácidos de la solución resultante con un analizador automático, se obtiene una concentración de los mismos bastante superior a la correspondiente a los aminoácidos libres. Esto indica que existe una determinada concentración de nitrógeno en forma de péptidos solubles en etanol-agua.

En las Fig. 13 y 14 (pág. 149 y 150) se han reproducido fotográficamente los cromatogramas correspondientes al análisis de los aminoácidos en la solución resultante de la hidrólisis en las parcelas N_1 y C_1 del extracto de etanol-agua.

T a b l a X V I

Concentración de nitrógeno soluble en etanol-agua
en el líber de las raíces
(16-4-70)

		% N en el líber seco		
		N total soluble en etanol-agua	N en forma de aminoácidos libres	N en forma de arginina
parcelas abonadas	N ₁	0,435	0,134	0,127
	N ₂	0,372	0,134	0,129
parcelas control	C ₁	0,100	0,0078	0,0027
	C ₂	0,126	0,005	+

Los resultados de estos análisis y del análisis de los aminoácidos libres para los árboles de las mismas parcelas N₁ y C₁ están consignados en la Tabla XVII (pág. 151). Los árboles de las parcelas N₂ y C₂ presentan unos valores muy semejantes a sus paralelas, por lo que no han sido consignados en la tabla.

Los aminoácidos señalados con un asterisco (*) no forman parte de los comúnmente encontrados en las proteínas. La com

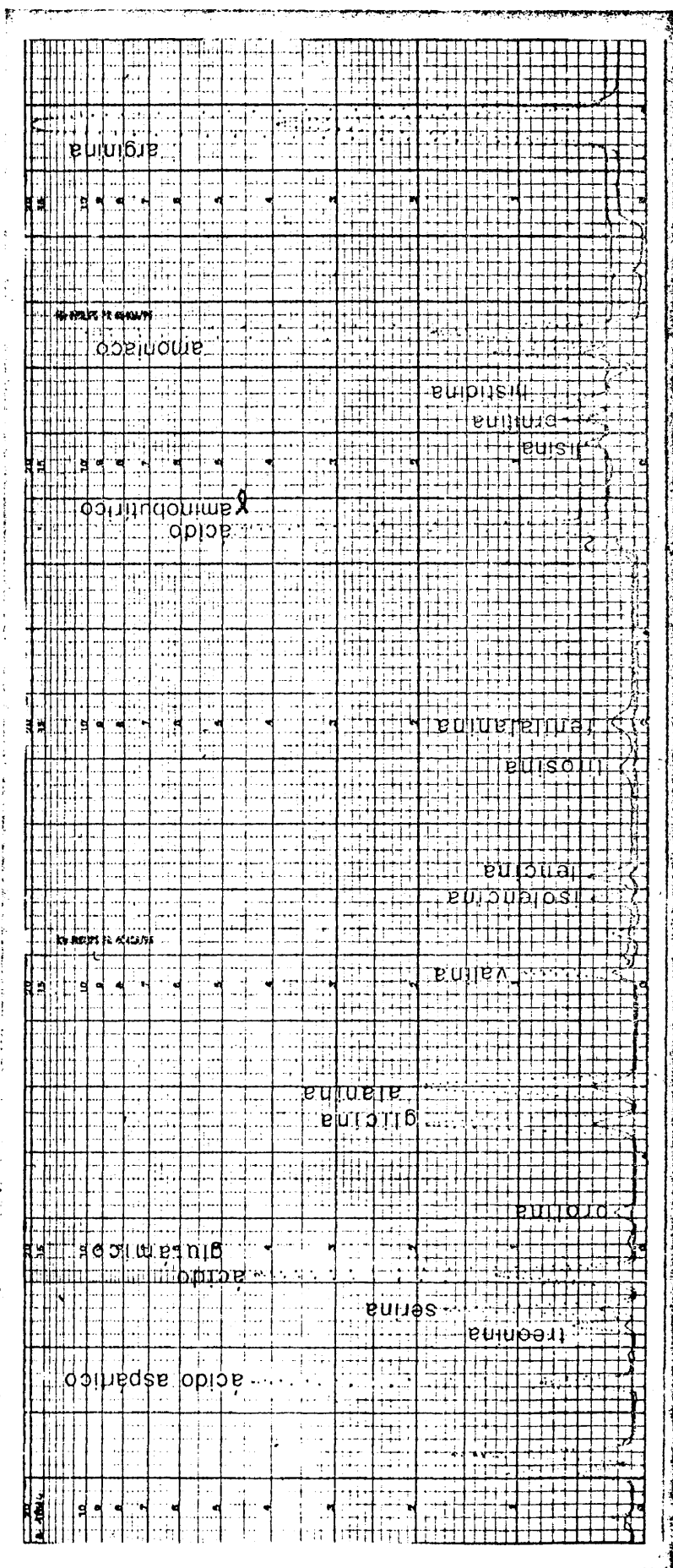


Fig. 13. Análisis de aminoácidos en la solución resultante de la hidrólisis del extracto de etanol-agua, procedente del líber de las raíces de la parcela abonada con nitrógeno, N₁. Ebersberger Fast, abril 1970

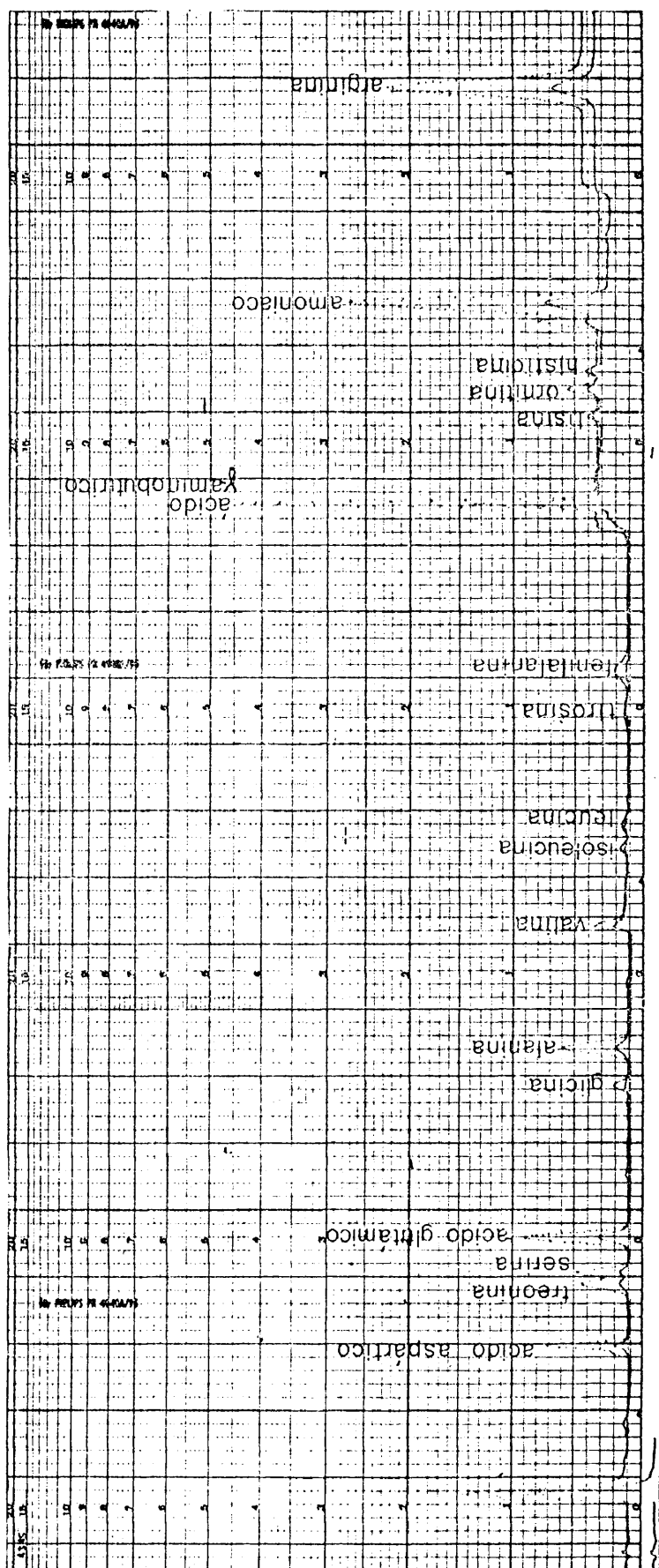


Fig. 14. Análisis de aminoácidos en la solución resultante de la hidrólisis del extracto de etanol-agua, procedente del líber de las raíces en la parcela Control C₁. Ebersberger Forst, abril 1970.

T a b l a XVII

Resultados del análisis automático de aminoácidos en el extracto de etanol-agua del líber de las raíces (16-4-70)

Parcela abonada N₁

Parcela control C₁

Aminoácidos	Aminoácidos libres	Aminoácidos después de la hidrólisis del extracto	Aminoácidos libres	Aminoácidos después de la hidrólisis del extracto
<hr/> $\mu\text{mol}/100\text{g}$ del líber seco <hr/>				
. Ac. aspártico	122,0	310	63,69	218
. Treonina	63,84	65	69,64	89
. Serina	69,48	124	48,02	226
. Ac. glutámico	85,91	635	90,47	466
. Prolina	+	90	-	-
. Glicina	+	240	+	295
. Alanina	135,21	275	50,00	158
. Valina	+	56	+	+
. Isoleucina	+	+	+	+
. Leucina	+	+	+	+
. Tyrosina	+	+	+	+
. Fenilalanina	+	+	+	+
. -aminobutírico ^(*)	no det.	no det.	no det.	no det.
. Histidina ^(*)	+	+	+	+
. Ornitina	+	+	+	+
. Lisina	+	+	+	+
. Arginina	2276	3800	126	290

- = no encontrado

+ = cantidades pequeñas

(*) = no encontrado comunmente en proteínas.

paración con muestras auténticas de varios aminoácidos encontrados en otras especies de *Picea* (DURZAN⁽¹²⁶⁾) mediante análisis automático y cromatografía de placa fina ha dado en todos los casos las características del ácido -aminobutírico para la primera y ornitina para la segunda. Su concentración no ha sido determinada.

La treonina puede venir acompañada por las amidas glutamina y asparraguina, bajo las condiciones en que se han realizado los análisis automáticos. Sin embargo, en nuestro caso no se ha podido detectar por cromatografía de placa fina la presencia de estas amidas, por lo que el valor consignado en la tabla corresponde solamente a treonina.

Un valor destaca en la tabla, tanto en el análisis de aminoácidos libres como en el de la solución resultante de la hidrólisis, es la elevada concentración de arginina en la parcela abonada con nitrógeno (N_1). Muchos autores han llamado la atención acerca de la importancia de este aminoácido, como sustancia de reserva y por su rápida respuesta a un abonado con nitrógeno, variable por otra parte con el abono utilizado (MOTHES⁽¹²⁷⁾, DURZAN y STEWARD⁽¹²⁸⁾, BARNES y BENGTON⁽¹²⁹⁾, TROMP⁽¹³⁰⁾, E-BELL y McMULLAN⁽¹³¹⁾).

Este aumento tan notable en la concentración de arginina se observa también claramente por cromatografía de placa fina (Fig. 15, pág. 153). El cromatograma se ha desarrollado con

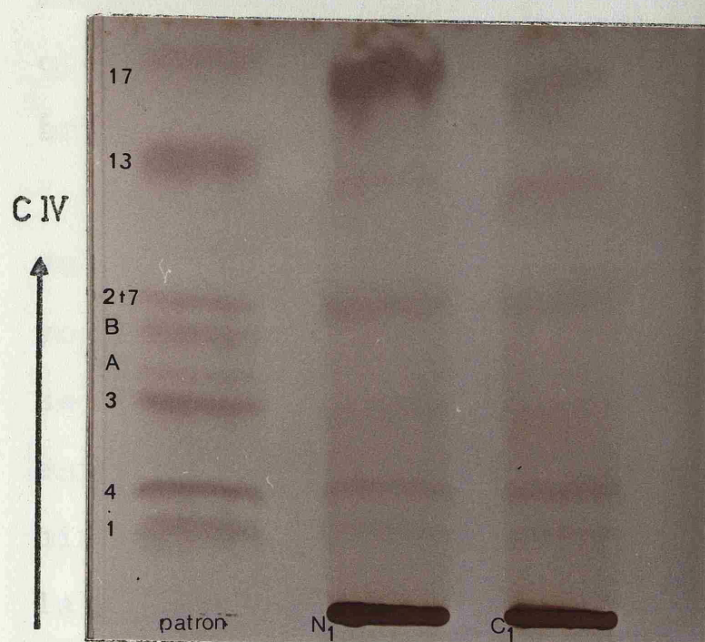


Fig. 15. Cromatograma sobre celulosa de una muestra patrón de aminoácidos y se los extractos de etanol-agua de las parcelas N_1 y C_1 revelado con ninhidrina

fenol-agua (C IV, Tabla II, pág. 68) utilizándose como revelador ninhidrina.

En el cromatograma se ha aplicado a la izquierda una mezcla patrón de aminoácidos, en el centro una muestra del extracto de etanol-agua de la parcela N_1 y a la derecha una muestra del mismo extracto de la parcela C_1 . Los números se corresponden con los de las sustancias de la Tabla XVII (pág. 151). Las sustancias señaladas con A y B corresponden a las amidas as parraguina y glutamina, que este mes, como se puede comprobar, no están presentes ni en la parcela abonada ni en la control.

Del resto de los aminoácidos sólo el ácido aspártico ha sufrido un aumento digno de mención como consecuencia del abonado. Aunque los árboles de la parcela N_1 presentan un contenido

mayor en alanina, no se puede tomar en cuenta esta subida, ya que la concentración de este aminoácido varía mucho entre los árboles.

Para comprobar si la arginina ejercía un efecto positivo sobre el crecimiento del *Fomes annosus*, se realizaron ensayos biológicos con el hongo sobre sustrato de agar-malta al que se le habían añadido, en un caso, distintas concentraciones de este aminoácido, y, en otro, las mismas concentraciones de arginina pero acompañadas de 1 g de líber fresco de los árboles de la parcela control C₁, correspondiente al mes de abril. Por ser la arginina un aminoácido básico, se disolvió en 1 ml de solución tampón de fosfato (pH = 5,8). 1 ml de esta misma solución fue añadido a las placas Petri tomadas como testigo.

Los resultados de estas investigaciones están consignados en la Tabla XVIII (pág. 155).

Según los valores expuestos en la tabla anterior, la arginina favorece el crecimiento del micelio del *Fomes annosus* cuando está presente en determinadas concentraciones, tanto en el caso de añadirse únicamente arginina como cuando se añade arginina y líber molido. Por encima de esas concentraciones, sin embargo, puede llegar a inhibir el crecimiento del hongo.

En los ensayos biológicos frente a *Fomes annosus*, realizados con líber fresco de las 4 parcelas, y cuyos resultados se expusieron en la Tabla XIX (pág. 144), se añadió 1 g de líber

T a b l a X V I I I

Ensayos biológicos con el *Fomes annosus*
(Diámetro del crecimiento del micelio en mm)

	% de arginina en agar por placa Petri				
	0	0,0025	0,005	0,01	0,02
Agar-malta	56,5				
Agar-malta +tampón +arginina	58,2	65	63,7	58,2	57,2
Agar-malta +tampón +líber fresco +arginina	48	51,8	49,4	47,1	47,1

fresco, aproximadamente 500 mg de líber seco, a cada placa Petri. Teniendo en cuenta los valores consignados en la Tabla XVI (pág. 148), referentes a las concentraciones de arginina en el líber de las parcelas, cada placa Petri tendría una concentración de arginina de un 0,005%, a la cual le correspondería un aumento en el crecimiento del hongo. Por tanto la arginina puede haber tenido parte activa en la disminución de la acción inhibi

dora en las parcelas abonadas.

Considerando los resultados obtenidos en los análisis de abril desde el punto de vista fitopatológico, se puede concluir que dado que el abonado con nitrógeno no cambia ni la concentración total ni la composición cualitativa de los polifenoles del líber de las raíces, la debilitación de la acción inhibidora del líber se debe muy probablemente a su enriquecimiento con sustancias nitrogenadas, entre ellas aminoácidos.

El hecho de que altas cantidades de nitrógeno en la madera hagan decrecer su resistencia o aumenten su susceptibilidad a la pudrición es bien conocido. COWLING y MERRILL⁽¹³²⁾ recogiendo los resultados obtenidos por varios investigadores afirman que los hongos destructores de la madera pueden utilizar para su nutrición distintas formas de nitrógeno, pero el que da lugar a un crecimiento mayor es el nitrógeno en forma "amino". Los distintos aminoácidos dan lugar para cantidades equimoleculares de nitrógeno a crecimientos también distintos y combinaciones de los mismos producen efectos mayores que cada uno de ellos por separado para la misma concentración total de nitrógeno. Más efectivas se han mostrado todavía en algunos casos las mezclas de aminoácidos libres y péptidos. Estos últimos por sí solos pueden dar lugar a un crecimiento mayor que medios nutritivos conteniendo cantidades equimoleculares de los aminoácidos de que están constituidos. También las proteínas pueden ser uti

lizadas por los hongos xilófagos como fuente de elementos nutritivos.

Según algunos autores sin embargo (FLOOD y KIRKHAM⁽²⁷⁾, FARKAS y KIRALY⁽¹³³⁾), el mecanismo envuelto en el fenómeno de debilitación de la resistencia de la madera a causa de los compuestos nitrogenados es mucho más complejo y hasta ahorapoco conocido. No sólo hay que considerarlos aislados como fuente de nutrición, sino que es interesante también la relación entre los fenoles -como sustancias fungitóxicas- y la cantidad de nitrógeno soluble. Según los primeros autores (FLOOD y KIRKHAM) es posible que la diferencia entre variedades susceptibles y resistentes se deba sólo a esta relación. En opinión de FARKAS y KIRALY pequeñas cantidades de aminoácidos facilitan el crecimiento de hongo, mientras que grandes cantidades podrían aumentar la resistencia al resultar venenosas para el patógeno, lo que se vería confirmado en los ensayos biológicos con arginina realizados en este trabajo.

Para investigar las consecuencias de una nueva subida en la concentración de nitrógeno, en mayo de 1970 se abonaron otra vez las parcelas N₁ y N₂ con 256 Kg N/ha en forma de sulfato amónico. En junio y en setiembre se tomaron muestras de líber, realizándose con ellas los análisis y ensayos biológicos acostumbrados, cuyos resultados están expuestos en la parte superior de la Tabla XIX (pág. 158). Se han añadido nuevamente

Composición química de los extractos y acción inhibidora del líber de las raíces de abetos rojos abonados con nitrógeno y de los tomados como control en abril, junio y setiembre de 1970

Parcelas	Extr. de cloroformo sust. resinosas	Polifen. libres	Glucósi dos	Catequi nas	Total		Almidón	Azúcares	Total aminoácidos libres	Inhib. relativa
					sustancias inhibidoras	% del líber seco				
									mol/100g del líber seco	%/0,5g del líber seco
abon. Abril	N ₁	2,56	1,28	23,22	4,72	31,78	6,60	1,70	2752,43	2
	N ₂	2,18	1,40	25,60	4,50	33,68	6,09	2,46	2682,32	7
	C ₁	2,32	1,37	23,00	4,28	30,97	6,10	2,30	369,44	28,2
	C ₂	2,74	0,92	20,50	4,24	28,40	6,50	1,35	368,63	19,5
abon. Junio	N ₁	2,64	2,30	25,50	4,90	32,70	5,00	1,35	5963,50	33,6
	N ₂	2,57	2,13	26,98	4,54	33,65	4,90	2,65	5576,00	34,2
	C ₁	1,82	2,04	25,00	4,18	31,22	4,00	2,30	416,00	39,5
	C ₂	4,73	2,34	25,98	4,80	33,12	4,38	1,40	490,00	40,0
abon. Septiembre	N ₁	3,11	1,10	24,25	4,58	33,04	4,65	1,27	4571,50	23,3
	N ₂	2,04	1,25	25,08	5,00	33,37	5,76	2,51	3950,00	21,9
	C ₁	2,32	1,13	18,64	4,72	26,81	5,08	1,87	830,50	11,5
	C ₂	3,48	1,18	18,94	6,00	29,60	6,84	1,34	604,70	11,0

los resultados obtenidos en abril de 1970 para facilitar la comparación.

En el mes de junio se observa en las dos parcelas un crecimiento en la concentración de las sustancias inhibidoras y una disminución en la concentración de azúcares. La concentración total de aminoácidos crece ligeramente en las parcelas control, mientras en las abonadas se dobla su valor. Arginina ha alcanzado también un valor doble del obtenido en abril, como se puede deducir de la comparación de la Tabla XX y la tabla XVI (pág.148).

T a b l a X X

Concentración de nitrógeno soluble en etanol-agua
en el líber de las raíces
(9-6-70)

		% N en el líber seco		
		N soluble en etanol-agua	N en forma de aminoácidos libres	N en forma de arginina
parcelas abonadas	N ₁	0,467	0,278	0,260
	N ₂	0,451	0,277	0,255
parcelas control	C ₁	0,146	0,011	0,007
	C ₂	0,146	0,025	0,008

En las parcelas control la acción inhibidora es en junio algo mayor que en abril, y en las abonadas muchísimo mayor aunque su valor permanece aún por debajo del de las parcelas control. Este enorme crecimiento de la acción inhibidora en las parcelas abonadas se puede deber por una parte a la mayor concentración de sustancias fungitóxicas que contrarresta la acción de los aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas; por otra parte, a la posibilidad de que esa concentración tan elevada de nitrógeno y principalmente de arginina sea venenosa para el hongo.

En el mes de setiembre, parte inferior de la Tabla XIX (pág. 158), la acción inhibidora en los árboles de las parcelas control ha sufrido una fuerte depresión, típica para esta época del año (4.1.2.2), correspondiente a una disminución en sustancias fungitóxicas, principalmente glucósidos. En comparación, la disminución de éstos en las parcelas abonadas es muchísimo menor y consecuentemente también la acción inhibidora es mayor que en las control. La causa de esta anomalía no se conoce.

Los aminoácidos han vuelto a experimentar una pequeña subida en las parcelas abonadas. En las Fig. 16 y 17 (pág. 161 y 162) están reproducidos los cromatogramas correspondientes al análisis automático de aminoácidos en las parcelas N_1 y C_1 en el mes de setiembre de 1970. Es de notar el aumento experimentado en la parcela abonada por la sustancia identificada como ornitina.

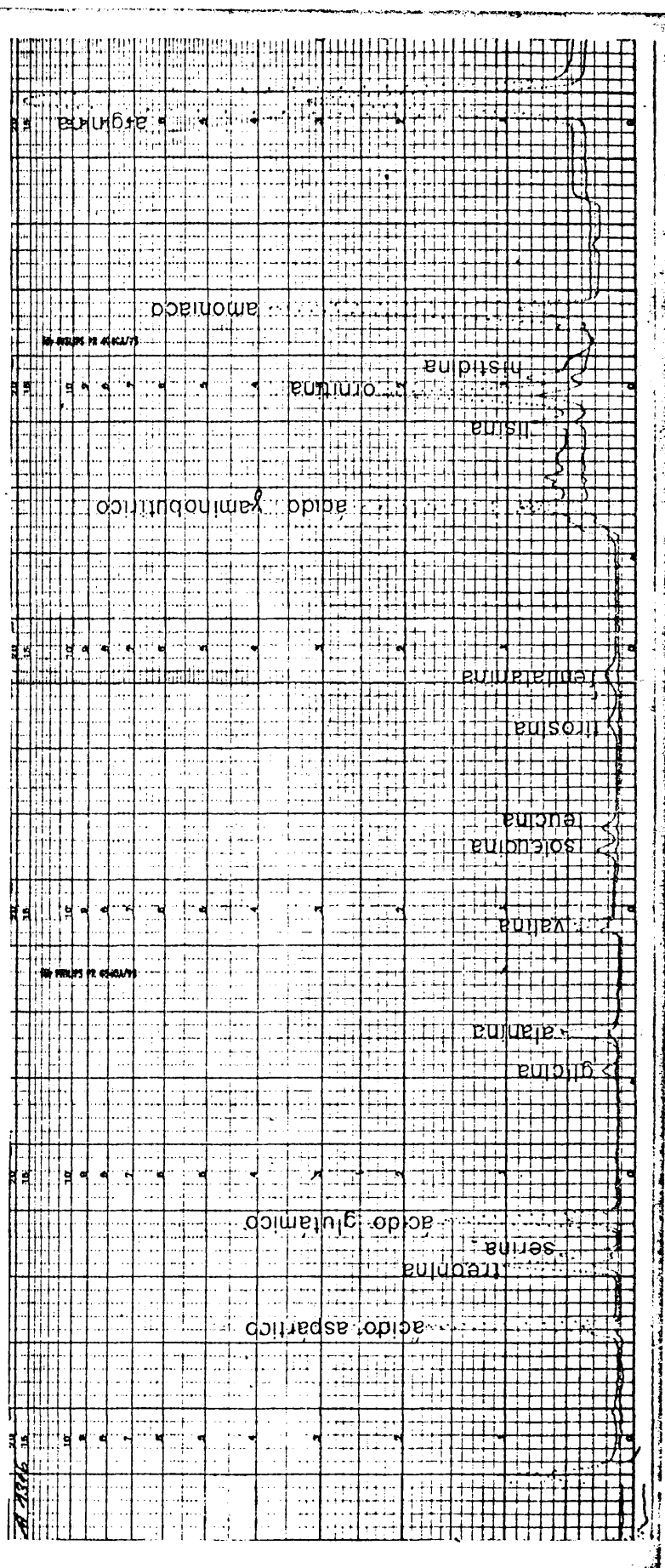


Fig. 16. Análisis de los aminoácidos libres del extracto de etanol-agua, procedente del líber de las raíces de la parcela abonada con nitrógeno, N₁. Ebersberger Forst, setiembre 1970.

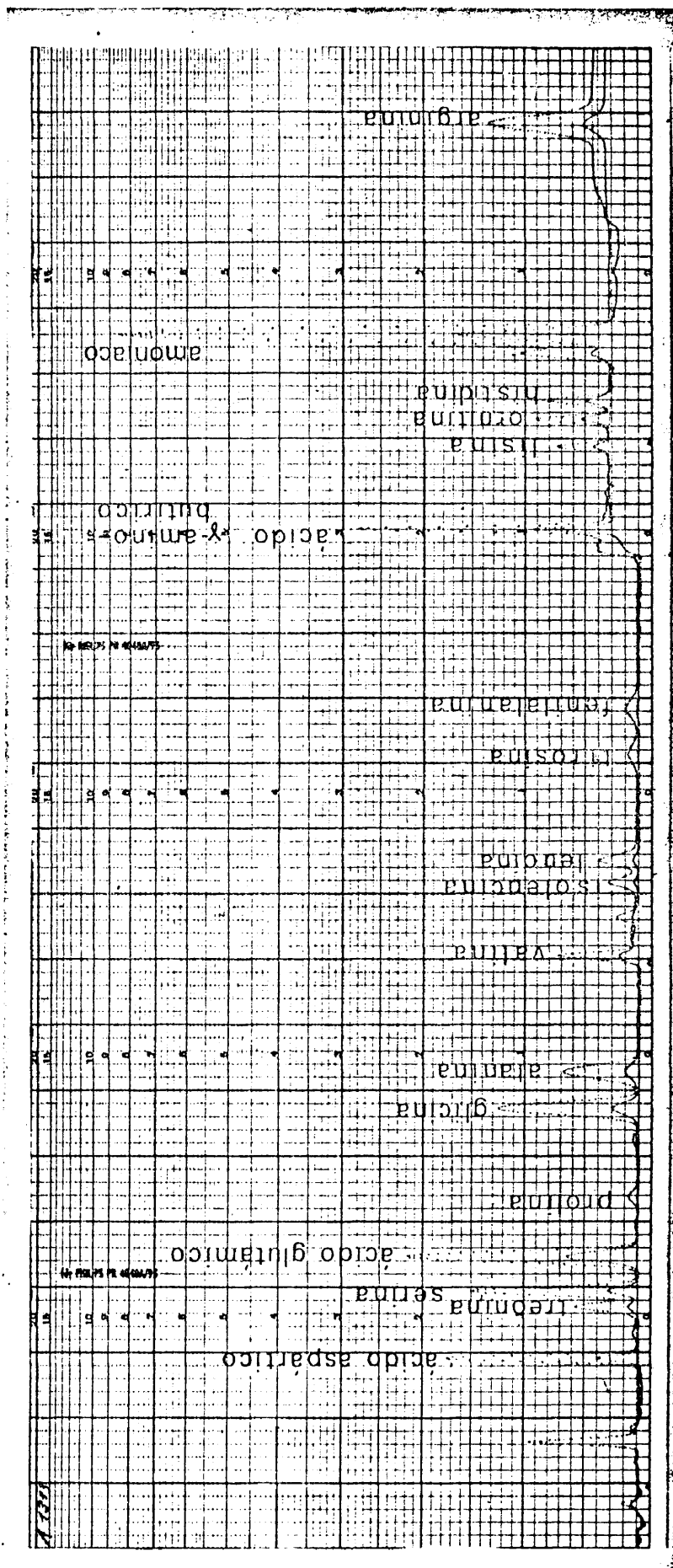


Fig. 17. Análisis de los aminoácidos libres del extracto de etanol-agua procedente del líber de las raíces de la parcela control, C₁. Ebersberger Forst, steiembre 1970.

Durante el invierno 69-70 los árboles de las parcelas abonadas sufrieron mucho más que los de las parcelas control bajo el peso de la nieve, doblándose y llegando a quebrarse, lo que parece indicar una falta de buena lignificación. Según FREY, WISSLING y NEISH, para lograr una buena lignificación es necesario que los árboles no contengan demasiado nitrógeno (citado por ZIMMERMANN⁽¹³⁴⁾).

Concentraciones de nitrógeno tan elevadas como las que se han obtenido en la segunda parte del experimento, es improbable que se presenten en la naturaleza e incluso que sean alcanzadas con un abonado, por lo que la parte primera del experimento, entre abril de 1968 y abril de 1970, es la que permanece como más interesante.

Significado fitopatológico del experimento. Conclusión. En la Fig. 18 (pág. 164) está representada la acción inhibidora de las parcelas N_1 y N_2 (abonadas) y C_1 y C_2 (controles) en abril de 1968 (izqda.) y en abril de 1970 (dcha.). En ella se aprecia claramente la reducción de la acción inhibidora en las parcelas N_1 y N_2 como consecuencia de los abonados durante los periodos de actividad vegetativa de 1968 y 1969.

Esta disminución del efecto inhibidor del líber como consecuencia del abonado podría ser pues una de las causas implicadas en la mayor frecuencia de la pudrición del duramen en suelos muy ricos en nitrógeno. PLATT et al.⁽¹²⁰⁾ han comprobado me

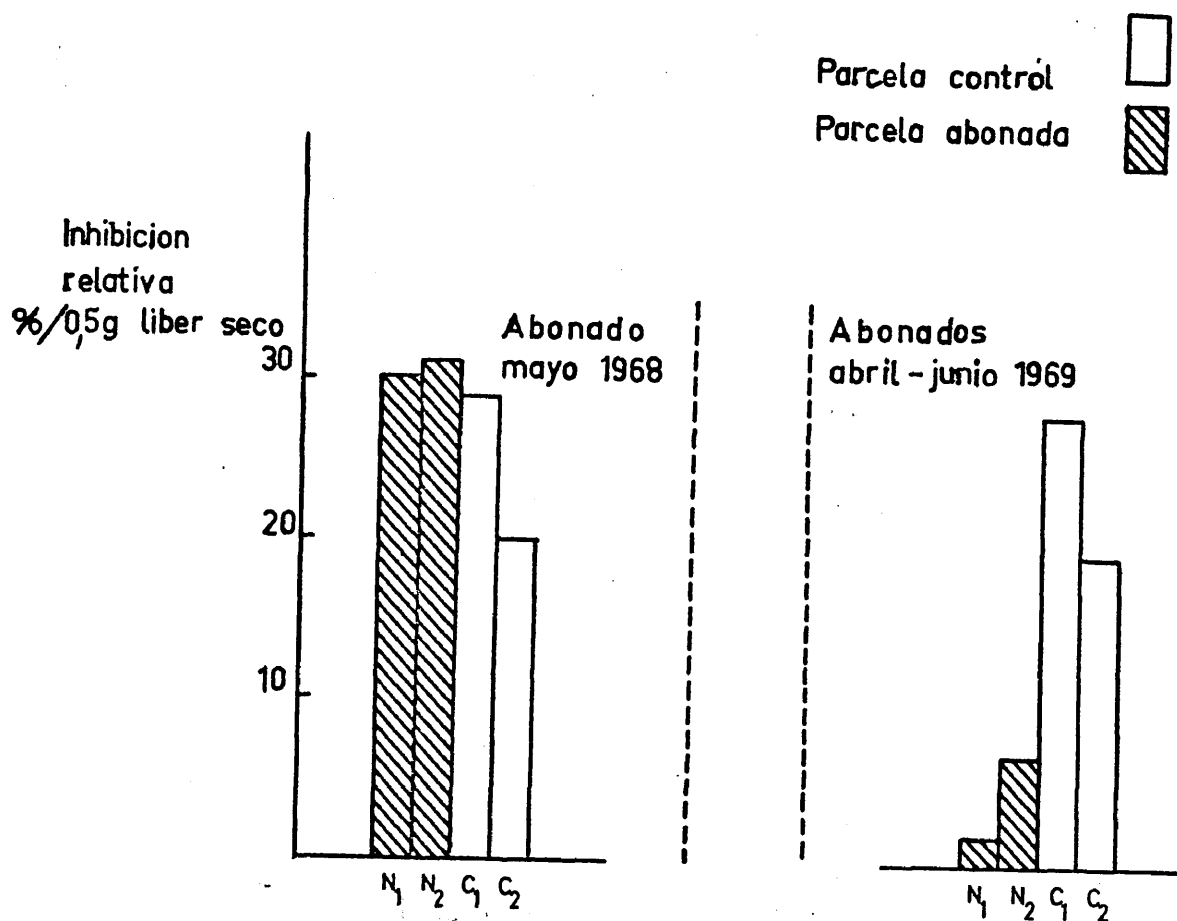


Fig. 18 Influencia de un fuerte abonado con nitrógeno sobre la acción inhibidora del liber de las raíces del abeto rojo

diante ensayos con probetas de madera del tronco y de las raíces de 8 especies de coníferas que la pérdida de peso experimentada en estas últimas por acción del *Fomes annosus* era significativamente mayor que la del tronco y atribuían esta diferencia a la mayor cantidad de nitrógeno y de hidratos de carbono de reserva que poseían las raíces.

4.2 Resultados de los ensayos llevados a cabo con oleorresina

Como ya se dijo en la introducción tanto éste como el próximo apartado, en el que se estudian los ensayos realizados con madera (4.3) constituyen dos capítulos adicionales que añaden nuevos puntos de vista a la búsqueda de relaciones entre el estado de nutrición de los árboles y su resistencia a la "putridición del duramen".

El examen completo, tanto de la oleorresina como de la madera, exige una dedicación a la que no se intentaba llegar en nuestro caso, sino simplemente se han querido realizar unos ensayos previos orientadores que dan idea de su importancia y abren camino para una posterior investigación.

En los estudios anteriores, 4.1 y 4.2 se ha visto cómo el líber del abeto rojo debido a su contenido en sustancias fungitóxicas ejerce una acción inhibidora sobre el crecimiento del micelio del *Fomes annosus*, acción inhibidora que depende de la estación del año y del estado de nutrición de los árboles. El líber pues cuando está intacto se debe comportar como una barrera defensiva más o menos fuerte según los casos. A fin de comprobarlo el Prof. Rehfuess del Instituto de Edafología de la Universidad de Munich está realizando actualmente infecciones con el *Fomes annosus* en raíces de *Picea abies*, en plantaciones con distintos estados de nutrición. Cuando

este líber sin embargo se agrieta, tanto si es debido a causas naturales como si es provocado artificialmente, o bien si es herido como consecuencia del ataque del hongo (BRAUN y LULEV⁽²¹⁾), se observa una exudación de oleorresina más o menos fuerte según la época del año en que tenga lugar, que podría ser una nueva defensa a la penetración del hongo.

Dos cuestiones se presentan especialmente interesantes en la investigación de este fenómeno:

- 1°. ¿Ejerce la oleorresina una acción inhibidora sobre el *Fomes annosus*?
- 2°. ¿Varía la cantidad de oleorresina exudada por los árboles con la época del año y el estado de nutrición de los mismos?

4.2.1 Acción inhibidora de la oleorresina sobre el *Fomes annosus*

Para realizar los ensayos biológicos frente a *Fomes anno*sus con la olorresina del abeto rojo se tomaron muestras de la misma a 1 m de altura en el tronco de árboles de 30 a 40 años , en el mes de julio de 1970 en Ebersberger Forst.

La exudación de resina tuvo lugar fundamentalmente en la superficie de la albura por lo que se trata pues, en su mayor parte de oleorresina (ver apartado 2.3.2).

La oleorresina fue disuelta en acetona y de la solución se hicieron dos partes. Una se ensayó directamente con el *Fomes*

annosus; en la otra se dejó evaporar el disolvente obteniéndose de esta forma una masa cristalina blanca cubierta con una capa oleosa amarilla. Ambas, la fracción cristalina y la fracción oleosa se ensayaron por separado frente al *Fomes annosus*. La proporción entre ambas varía según la época del año. Con ellas se han realizado también ensayos biológicos. El examen por cromatografía de capa fina de las fracciones cristalina y oleosa, con los disolventes de desarrollo Sg III y Sg IV, muestra que se trata de mezclas muy complejas. En la fracción cristalina se ha podido detectar la presencia de ácido abiético por comparación con una muestra auténtica de esta sustancia (de la casa Roth, Karlsruhe). El ácido abietico es, como ya se dijo en la parte teórica, uno de los componentes principales de la oleoresina de muchas especies de *Picea* y de *Pinus*, aunque no se sabe todavía si existe en realidad en el árbol o si es el resultado de transformaciones posteriores a la exudación (MUTTON⁽⁷⁷⁾). Esta sustancia también ha sido ensayada con el *Fomes annosus* a título de comparación.

La cantidad de cada una de las muestras ensayadas correspondía al 0,25% del sustrato de agar-malta en las placas Petri. Los resultados de estos ensayos están registrados en la tabla XXI. Cada uno de los valores obtenidos representa el valor medio de cuatro placas Petri.

T a b l a XXI

Inhibición relativa en % de distintos preparados frente al
Fomes annosus

<u>Preparados</u>	<u>Inhib. relativa</u>
oleorresina	35%
fracción cristalina de la oleorresina	33%
ácido abiético	46%
fracción oleosa de la oleorresina	44,5%

A pesar de que tanto la oleorresina como las dos fracciones en que se ha dividido son sólo parcialmente solubles en agar-malta, -por lo que estos ensayos han de ser tomados únicamente como orientadores-, poseen una acción inhibidora comparable a la del extracto de cloroformo del líber -cuya inhibición relativa es del 35% (apartado 4.1.2.3)- y por tanto comparable también a la de la fracción polifenólica del mismo, ya que estos dos últimos preparados presentan efectos inhibidores semejantes.

La fracción cristalina muestra un efecto inhibidor menor que el del ácido abiético que se encuentra entre sus componentes.

Tanto en las placas Petri que contienen oleorresina como las que contienen su fracción oleosa se forman unas gotas

duras con aspecto de ámbar -sustancias sin disolver- que no son colonizadas por el hongo. Esto parece indicar que la barrera que puede oponer la oleorresina a la penetración del hongo es no sólo de tipo químico, denominando así su acción fungitóxica, sino además de tipo mecánico, es decir como una especie de lámina impenetrable para el agua que no permite la entrada del hongo.

La exudación de oleorresina como consecuencia del ataque del hongo puede constituir por tanto una defensa efectiva frente al mismo. REID y SHRIMPTON⁽⁶⁹⁾ han comprobado al inocular *Pinus contorta* con el hongo *Europhium clavigerum* que, en general, los árboles resistentes a la infección eran los que habían producido una cantidad mayor de resina.

La investigación de las sustancias causantes de la acción inhibidora de la oleorresina sobre el crecimiento será objeto de otros estudios dentro del programa de la "Rotfäule der Fichte".

4.2.2. Influencia de la sequía del suelo sobre la exudación de oleorresina

Estos experimentos se han llevado a cabo en Ebersberger Forst, durante el periodo de actividad vegetativa del año 1970, en las mismas parcelas que habían sido utilizadas el año anterior para estudiar el influjo de la sequía del suelo sobre el conte-

nido del líber en sustancias fungitóxicas.

Una de las parcelas se cubrió, de igual forma que en 1969, con lámina de polietileno el 9 de junio de 1970, y la otra, en la que ya se habían tomado pruebas de oleorresina en los meses de abril y mayo de 1970, se reservó como control. En cada una de ellas se eligieron cuatro árboles y en cada uno de éstos se produjeron dos heridas patrón con un taladrador ($\phi = 1,5$ cm) a 1 m de altura. La cantidad obtenida de cada árbol se pesó por separado y se expresó en mg por herida patrón. En cada toma de muestras se colectó la resina exudada por los árboles durante tres semanas.

En la fig. 20 se ha representado el peso medio de oleorresina obtenido por herida patrón a lo largo del periodo de actividad vegetativa en los árboles de la parcela control y en los de la cubierta.

La línea correspondiente a los árboles de la parcela control, que nos proporciona una imagen de la exudación de la resina del abeto rojo en las distintas épocas del año, parte de un valor casi nulo en los meses de invierno para subir luego rápidamente y alcanzar un máximo en julio-agosto - correspondiendo a los meses de temperatura más elevada - y descender hacía el otoño.

Considerando a la vez estos resultados y los obtenidos para la variación de sustancias fungitóxicas a través del año

mg oleorresina / herida patrón

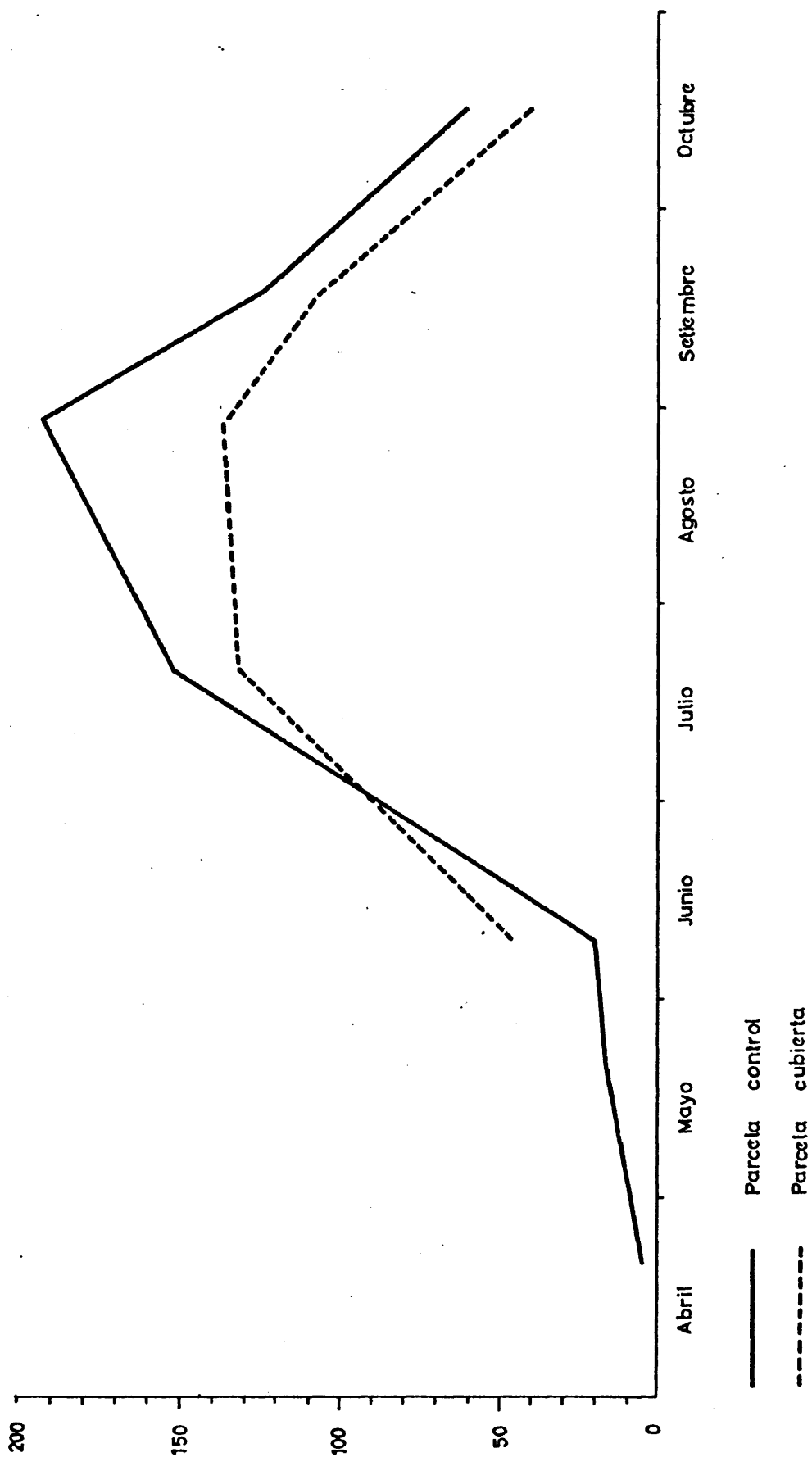


Fig. 20. Influencia de la sequía del suelo sobre la exudación de oleorresina en los abetos rojos (Ebersberger Forst, 1970)

(4.1.2.2) se presenta el verano, sobre todo los meses de julio-agosto, como los más difíciles para la penetración del hongo, ya que por una parte el árbol posee una mayor concentración de sustancias inhibidoras, y por otra la exudación de resina es más intensa.

En la parcela cubierta, cuyo valor en junio es superior al de la control, el máximo de los meses de verano es mucho más bajo, parece por tanto que la exudación de resina ha sido limitada por la falta de agua. Esto mismo ha encontrado GIBBS⁽¹⁰⁷⁾ al comparar la cantidad de oleorresina exudada por *Pinus sylvestris* en un hábitat forestal considerado como seco con otro definido como húmedo.

La sequía del suelo conduce pues no solo a una disminución de sustancias fungitóxicas en el líber del abeto rojo (4.1.3.1) sino también a una producción de oleorresina más pequeña, lo que puede facilitar la colonización de árboles que crecen en hábitats forestales con suelos sometidos a sequías periódicas, y explica la mayor frecuencia de la "pudrición del duramen" en los mismos.

4.2.3 Influencia de un suelo rico en carbonatos sobre la exudación de oleorresina

WENZEL y KREUTZER⁽¹⁶⁾ habían observado ya que las heridas de árboles con deficiencia en manganeso de la estación

forestal de Günzburg (características de la misma en 4.1.3.2) presentaban una exudación de oleorresina mucho más pequeña que los sanos. Para comprobar cuantitativamente esta diferencia se tomaron muestras de oleorresina de árboles sanos y enfermos correspondientes a la exudación de la misma entre el 16 de junio de 1970 y el 23 de julio siguiente.

En cada parcela se realizaron los ensayos en cinco árboles de 17 años, produciendo dos heridas patrón por árbol a 1 m de altura, en todos los casos en la misma orientación. En el caso de los árboles con falta de manganeso la exudación de resina fue tan pequeña - como se comprobará por los datos recogidos en la tabla XXII- que solamente consistió en un par de gotas que se mantuvieron en la superficie de la albura y fueron

T a b l a XXII

Producción de orleorresina (mg/herida patrón)
(Günzburg, julio 1970)

Arbol n ^o	Arboles sanos	Arboles con deficiencia en manganeso
1	82	9
2	134	3
3	50	2
4	86	11
5	80	23

valor medio

86,4

9,6

separadas de ella cuidadosamente con un escalpelo. El valor consignado para cada árbol es la media de las dos heridas patrón.

Aunque existen diferencias entre los árboles individuales, sin embargo, la tendencia de los árboles sanos y enfermos está claramente expresada por estos valores.

Desde el punto de vista fitopatológico, los árboles con deficiencia en manganeso, debido a la combinación de una menor concentración de sustancias inhibidoras en el líber (4.1.3.2) por una parte, y de una producción más pequeña de oleorresina en sus heridas por otra, están predispuestos de manera especial a una infección por los hongos.

4.3 Resultados de los ensayos llevados a cabo con la madera

Aunque la madera del abeto rojo sea poco resistente a la pudrición, sin embargo existen grandes diferencias entre los árboles individuales en cuanto a la extensión de la madera enferma, tanto en diámetro como en altura (ZYCHA y DIMITRI⁽⁴⁾). El aspecto que presentan los tocones de árboles enfermos después de la tala, puede variar mucho de unos a otros, por lo que surge espontánea la cuestión de si una vez que el hongo por diversas causas haya logrado atravesar el líber, encuentra en la madera una resistencia, bien preexistente, o, provocada por su ataque, y si esta resistencia a la vez está influida por el estado de nutrición de los árboles. En nuestros trabajos hemos investigado el primer punto.

4.3.1 Ensayos biológicos con el Fomes annosus

El primer paso del estudio sobre la madera ha sido la investigación de su acción inhibidora sobre el Fomes annosus, por medio de ensayos biológicos sobre sustrato de agar-malta.

A tal efecto se tomaron por primera vez muestras de la madera de seis árboles, de igual diámetro y edad (40-45 años), recién talados, en una plantación de abetos rojos perteneciente al distrito forestal del Sur de Munich. De los seis árboles, tres estaban sanos y tres atacados por la "pudrición del dura-

men".

Fecha de la toma de muestras: 26 febrero 1970

Después de separar cuidadosamente la corteza y lavar el exterior de la albura con metanol para alejar los últimos restos de los polifenoles del cambium, la madera de los árboles sanos se divide en duramen y albura, atendiendo a su contenido en agua, apreciable a simple vista. El duramen, más seco, presenta color claro, mientras que la albura es más oscura. Los árboles sanos los designamos con los números I, II y III.

Los árboles IV y V presentan un duramen rojizo, enfermo, rodeado exteriormente por una zona amarillo-verdosa más estrecha en el árbol IV (1 cm) y más ancha en el árbol V (3 cm), la cual a su vez está rodeada por albura sana de color más oscuro debido a su gran contenido en agua. En el árbol VI faltaba esta zona amarillo-verdosa.

El aspecto que presentan los cortes transversales de ambos árboles, IV y V, al cabo de unos meses es distinto de cuando estaban frescos. La zona amarillo-verdosa se ha vuelto oscura, mientras que la albura, al perder la humedad, presenta un aspecto claro. La Fig. 18 reproduce fotográficamente el corte del árbol V al cabo de cuatro meses en la que se puede reconocer perfectamente el duramen enfermo, la zona que lo rodea y la albura sana.

Como se puede apreciar la zona intermedia no coincide con los anillos correspondientes al crecimiento anual, sino que

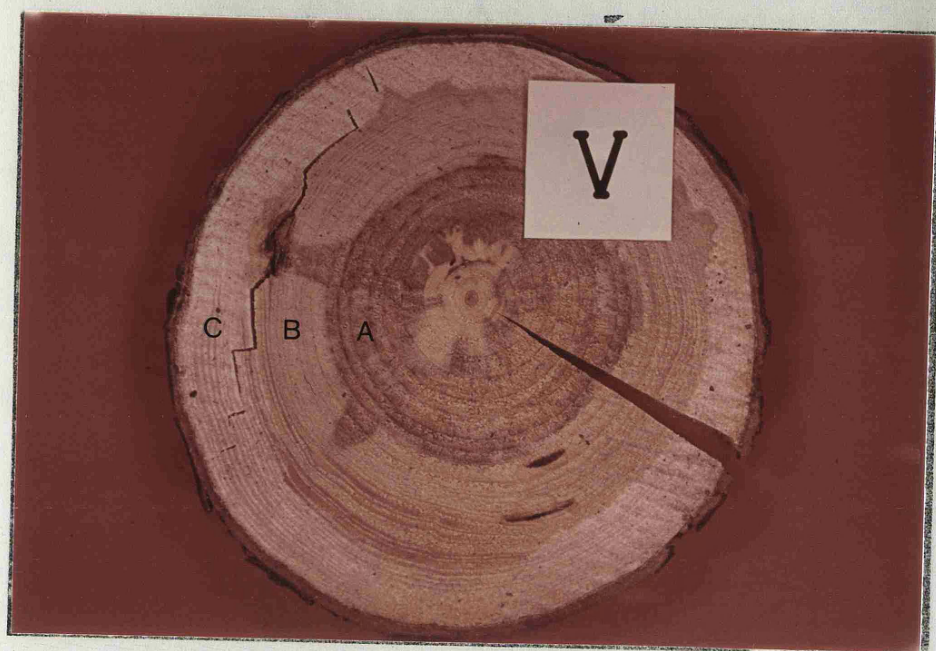


Fig. 18. Corte del tronco del árbol V
A = madera enferma
B = zona de reacción
C = albura sana

sus límites son irregulares. En otros árboles hemos observado que estos límites presentan un color más oscuro.

SHAIN⁽⁸¹⁾ encontró una zona de este tipo en sus estudios sobre *Picea abies*, y a semejanza de la de los *Pinus* la denominó "reactions zone". Nosotros hemos conservado este nombre y en lo sucesivo la llamaremos "zona de reacción". También NILSSON y HYPPEL⁽¹³⁵⁾ habían detectado zonas similares en raíces infectadas con *Fomes annosus*, alrededor de la madera enferma de pudrición.

El tercer árbol enfermo, VI, no presentaba, como se ha dicho, zona de reacción, sino que la madera enferma se extendía casi hasta el cambium por algunas partes, y alrededor de ella

podía observarse una zona que por su contenido en agua se parecía más al duramen que a la albura. Sólo en algunas partes, en los últimos anillos cercanos al cambium se podía ver madera algo más húmeda.

En los árboles enfermos las partes que se podían diferenciar a simple vista fueron separadas y molidas. Con la madera molida de los seis árboles se llevaron a cabo ensayos biológicos con el *Fomes annosus* utilizándose en cada caso un gramo de madera fresca. Los resultados de estos ensayos están consignados en la Tabla XXIII (pág. 179).

En la primera columna de números se ha registrado el contenido en agua de los tejidos expresado en tanto por ciento del peso seco de los mismos. Se observa la diferencia tan clara entre el contenido de agua del duramen y el de la albura en los árboles sanos. En los enfermos IV y V hay también diferencias entre madera enferma y albura sana. A la zona de reacción corresponde en ambos casos un valor más cercano al de la madera enferma que al de la albura. En el árbol VI la madera enferma y la sana tienen la misma cantidad de agua, como era de esperar de la información visual.

La segunda columna corresponde a la acción inhibidora sobre el crecimiento del micelio del *Fomes annosus*. Solamente la zona de reacción muestra efecto inhibidor. El resto de los tejidos, o bien no presenta ninguno (0), o, precisamente lo contra -

T a b l a XXIII

Porcentaje de agua e inhibición relativa de los distintos tejidos de los árboles sanos y enfermos
(26-2-70)

Arbol n ^o		% agua/peso seco	Inhib. relativa %/1 g de madera fresca	
Arboles sanos	I Duramen	20,7	0	
	Albura	90,0	(-)	
	II Duramen	20,0	(-)	
		Albura	95,0	(-)
	III Duramen	29,5	(-)	
		Albura	74,0	(-)
Arboles enfermos	IV Madera enferma	20,5	(-)	
		Zona de reacción	25,0	20
		Albura sana	75,5	(-)
	V Madera enferma	31,5	(-)	
		Zona de reacción	25,5	24
		Albura sana	96,0	(-)
	VI Madera enferma	25,0	(-)	
		Madera sana	25,0	0

0 = crecimiento como en las placas control

(-) = crecimiento mayor que en las placas control

rio, el hongo crece mejor sobre ellos (-). El pH de la zona de reacción (entre 7 y 8) es algo más elevado que el del resto de los tejidos (~ 5,8). Sin embargo no es ésa la causa de su acción inhibidora, pues al hacer los ensayos añadiendo una solución tan pón se obtiene el mismo efecto inhibidor.

Las placas Petri en las que se había añadido madera mo-lida de la zona de reacción, presentaban alrededor del inóculo u nos halos pardorrojizos semejantes a los que produce el líber mo lido, aunque algo más claros, mientras que estos halos no apare cían en ensayos con otros tejidos (duramen, albura, madera en -ferma). Tales halos se forman en general cuando se realizan ensayos con sustancias fenólicas. Esto hizo suponer que la inhibi ción observada era debida a la presencia en esa zona de sustancias fungitóxicas de carácter fenólico.

En el Instituto de la Madera de la Universidad de Munich está llevando a cabo Frl. Dr. v. Aufsess^(*) ensayos de "destrucción de madera", utilizando probetas de madera de la zona de reacción y madera sana de árboles enfermos, con relación al Fomes annosus. La pérdida de peso experimentada por las probetas de la zona de reacción es mucho menor que la que se observa en la madera sana del mismo árbol.

(*) Agradecemos a Frl. Dr. v. Aufsess esta información todavía no publicada.

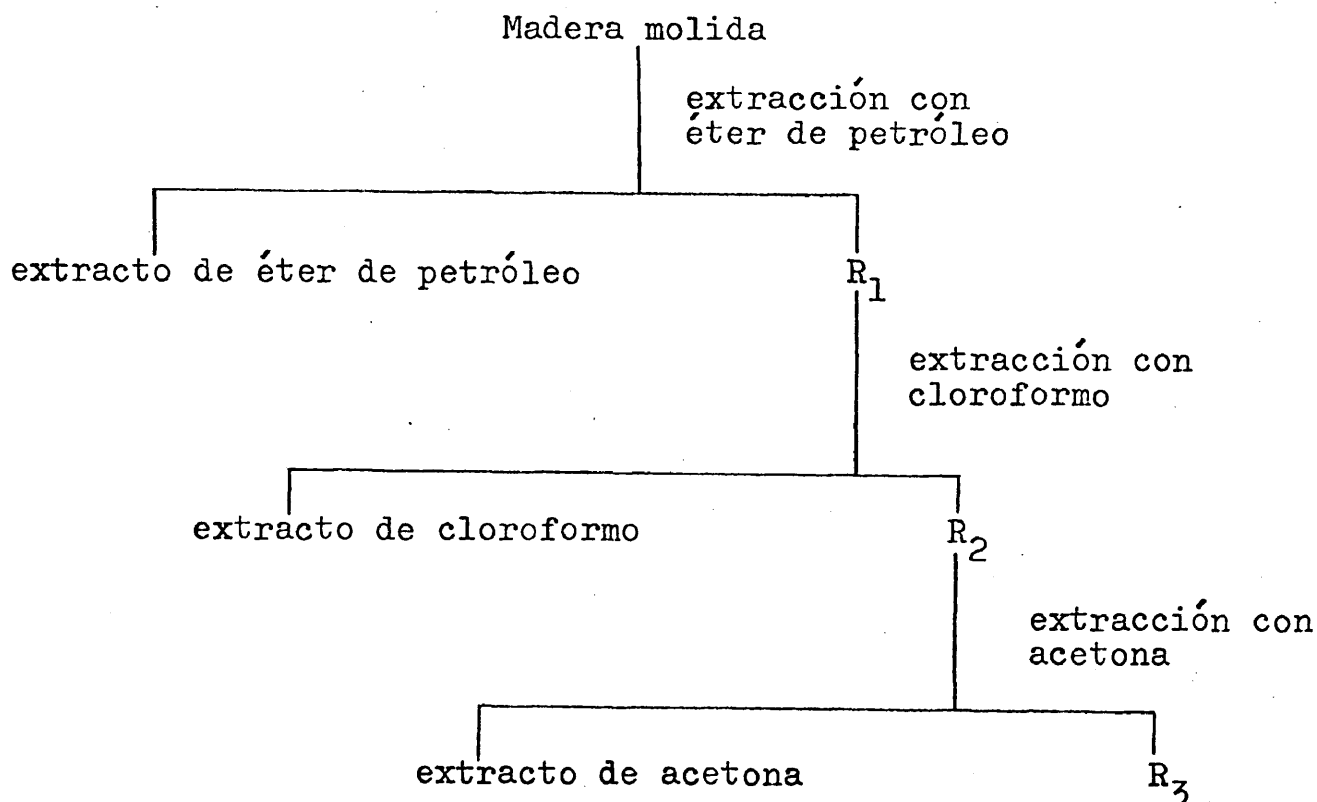
4.3.2 Extracción de la madera molida, examen cromatográfico de los extractos y propiedades fungitóxicas de los mismos

FREUDENBERG y KNOF⁽⁸³⁾ habían detectado ya en la madera de *Picea abies* la presencia de lignanos que fueron extraídos de la misma con acetona-agua; para nuestro estudio pareció más apropiado realizar una extracción fraccionada.

El proceso de extracción a que se sometió la madera molida de todos los tejidos ensayados frente al *Fomes annosus*, excepto de la madera enferma, está representado en el esquema II:

E s q u e m a I I

Proceso de extracción de la madera del abeto rojo



Primero se realizó una extracción con éter de petróleo para separar las sustancias grasas y otras solubles en este disolvente. El extracto muestra en todos los casos un pequeño carácter inhibidor para el *Fomes annosus*.

El residuo R_1 (que sólo si procede de la zona de reacción presenta carácter inhibidor) fue sometido a una nueva extracción, esta vez con cloroformo. El extracto de cloroformo posee un fuerte carácter fenólico en el caso de proceder del duramen o de la zona de reacción, y muy débil si procede de madera de albur.

El residuo R_2 , que en ningún caso muestra ya acción inhibidora, fue sometido a una nueva extracción con acetona.

Las concentraciones de los distintos extractos en los seis árboles que venimos estudiando se encuentran en la Tabla XXIV (pág. 183).

Al extraer la madera enferma con los distintos disolventes se obtuvieron soluciones que presentaban un aspecto muy diferente de las procedentes de otros tejidos, conteniendo sustancias extrañas, por lo que no se han consignado sus valores, ya que no pueden servir de comparación.

a) El extracto de éter de petróleo es blanquecino y grasiento en todos los casos. Su concentración es variable según los árboles, como se puede apreciar.

Por el examen cromatográfico del mismo mediante cromato

T a b l a XXIV

Porcentaje de los distintos extractos referidos al peso de la
madera seca
(26-2-70)

Arbol n ^o		Extracto de éter de petróleo	Extracto de cloroformo	Extracto de acetona
Arboles sanos	I	Duramen	1,00	0,65
		Albura	1,08	0,10
	II	Duramen	0,30	0,20
		Albura	0,67	0,10
	III	Duramen	0,96	0,20
		Albura	0,51	0,11
Arboles enfermos	IV	Zona de reacción	0,52	2,89
		Albura sana	1,21	0,20
	V	Zona de reacción	0,97	3,91
		Albura	1,19	0,10
	VI	Madera sana	1,03	0,50
				0,10

grafía de capa fina utilizando el disolvente de desarrollo Sg IV (Tabla II, pág.68) se observa que se trata de una mezcla muy compleja, de composición semejante en todos los tejidos analizados.

Con distintas concentraciones de extracto se han realizado ensayos biológicos frente a *Fomes annosus*. Los valores de inhibición obtenidos están recogidos en la Tabla XXV.

T a b l a XXV

Acción inhibidora del extracto de éter de petróleo de la zona de reacción frente al *Fomes annosus*

Concentración en agar %	Inhibición relativa %
0,005	ninguna
0,025	10,5
0,050	16,0
0,075	23,3

Teniendo en cuenta la baja concentración del extracto de éter de petróleo en los distintos tejidos (Tabla XXIV), y considerando que en los ensayos con madera molida frente al *Fomes annosus* se ha utilizado 1 g de madera fresca, la concentración que correspondería al extracto en agar sería del orden de 0,005%,

por lo que o bien no ejercería acción inhibidora alguna o sería muy pequeña.

b) El extracto de cloroformo se presenta en la zona de reacción en una proporción extraordinariamente grande en comparación con la correspondiente a los otros tejidos. En el caso de esta zona tiene aspecto espumoso y presenta un color rosa claro. El extracto de cloroformo del duramen de los árboles sanos también tiene aspecto espumoso, pero su concentración en el mismo es mucho menor que en la zona de reacción. El de la albura sana presenta aspecto grasiento.

Los extractos de cloroformo procedentes de los distintos tejidos de los seis árboles se examinaron por cromatografía de placa fina sobre silicagel utilizando los disolventes de desarrollo Sg III, Sg IV, Sg V, Sg VI y Sg VII (Tabla II, pág. 68). Los extractos de cloroformo de la zona de reacción presentaban las mismas sustancias que los del duramen de los árboles sanos y estas sustancias daban las coloraciones típicas de fenoles con distintos reactivos. Los de la albura sana no presentaron en ningún caso sustancias fenólicas.

En la Fig. 19 (pág. 186) está representado uno de estos cromatogramas en dos direcciones, correspondiente al extracto de cloroformo del árbol V, revelado con $\text{KMnO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$. A la luz UV se pueden detectar algunas sustancias más, presentes en menor cantidad.

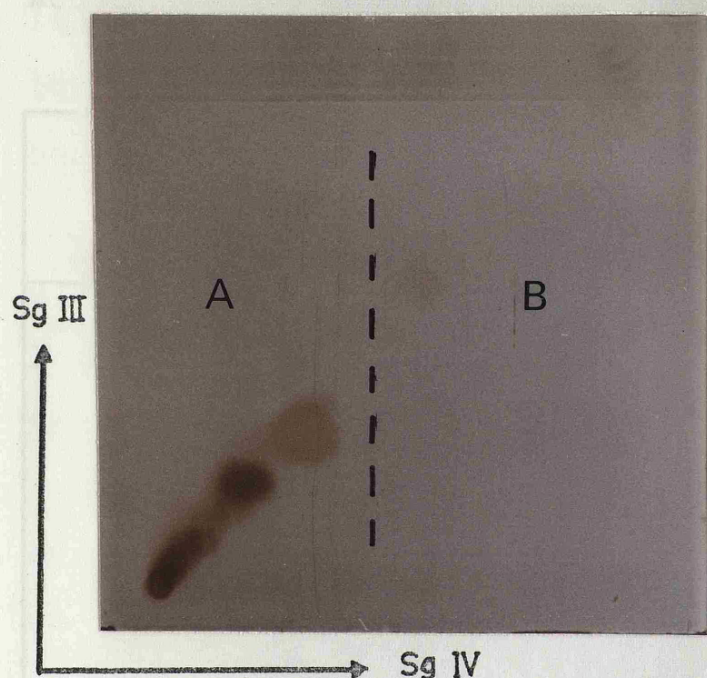


Fig. 19. Cromatograma sobre gel de sílice del extracto de cloroformo de la zona de reacción

1^a dirección Sg. III
2^a dirección Sg. IV

Con los extractos de cloroformo de la zona de reacción de los árboles IV y V a distintas concentraciones se realizaron ensayos biológicos con el *Fomes annosus*, cuyos resultados están registrados en la Tabla XXVI (pág.187). Las zonas de reacción de ambos árboles presentaron la misma inhibición.

Considerando la cantidad de extracto contenido en 1 g de madera molida fresca - que es lo que ha sido ensayado con el hongo -, resulta una concentración de 0,1% a 0,15% en agar a lo cual le correspondería una acción inhibidora del 25%, en perfecta consonancia con la de la zona de reacción (20% para el árbol IV y 24% para el V según la tabla XXIII, pág.179). La acción

T a b l a XXVI

Acción inhibidora del extracto de cloroformo de la zona de reacción de los árboles IV y V frente al *Fomes annosus*

Concentración en agar %	Inhibición relativa %
0,025	ninguna
0,050	17
0,075	24
0,100	25
0,125	25
0,150	25

inhibidora de la madera molida de la zona de reacción es más pequeña que la del extracto, lo cual es perfectamente comprensible, ya que en las placas Petri conteniendo el residuo R_2 procedente de la extracción con cloroformo el hongo crece mejor que en la placa testigo.

La acción inhibidora de la zona de reacción es pues debida, según estas investigaciones, no al valor de su pH sino a su concentración en sustancias inhibidoras.

Realizando ensayos biológicos con la misma concentración de extracto de cloroformo procedente de duramen de árboles

sanos se obtiene el mismo valor para la acción inhibidora. Esto parece indicar que las sustancias contenidas en ambos casos son las mismas pero en el duramen no se encuentran en la suficiente concentración como para producir un efecto inhibidor sobre el hongo.

Para comprobar si la acción inhibidora se debía a una única sustancia, o más bien a un grupo de ellas se separó el extracto de cloroformo en fracciones por medio de placas cromatográficas preparativas de silicagel.

26 mg del extracto -correspondientes a una concentración aproximada de 0,125% en agar en cada placa Petri- se aplicaron en forma de banda en seis placas, que fueron desarrolladas con el disolvente de desarrollo Sg IV (Tabla II, pág. 68). Una placa a la que no se había aplicado sustancia se utilizó como muestra de comparación para ver el efecto del adsorbente. Un centímetro del borde izquierdo de las placas se reveló con $\text{KMnO}_4 / \text{H}_2\text{SO}_4$ para localizar las sustancias. De tres de las seis placas se raspó la gel de sílice comprendida entre la línea de aplicación y el frente de desarrollo extrayendo las sustancias adsorbidas con acetona. El extracto se ensayó frente a *Fomes annosus* para comprobar si durante el proceso cromatográfico tenía lugar algún cambio que alterara la acción inhibidora de las sustancias. Sin embargo se obtuvo para la inhibición el mismo valor que en los ensayos realizados con 26 mg de extracto de cloroformo sin

cromatografiar. Esto nos indica además que la elución de las sustancias a partir de las placas es total.

En las otras tres placas se ensayaron por separado las dos zonas limitadas por la línea de puntos en el cromatograma de la Fig. 19 (pág.186), A y B.

Los valores de inhibición obtenidos están consignados en la Tabla XXVII.

T a b l a XXVII

Valores de la inhibición relativa del extracto de cloroformo de la zona de reacción y sus fracciones frente al *Fomes annosus*

	Inhibición relativa %
Extracto de cloroformo	25
Extracto de cloroformo eluido de las placas	25
Zona A eluida de las placas	12
Zona B eluida de las placas	15

Considerando estos valores se deduce que la acción inhibidora del extracto no proviene de una sustancia sino de la mezcla de varias.

¿Cuáles son estas sustancias? Aunque su identificación será objeto de otros trabajos se ha querido buscar una posible identidad con alguna de las sustancias identificadas por FREUDENBERG y KNOF⁽⁸³⁾ en el duramen de *Picea abies*, entre las que se encuentran (-) matairesinol (véase apartado 2.1.1.1) que se había mostrado fungitóxico en los ensayos llevados a cabo por RUDMAN⁽⁴⁵⁾. La Fig. 20 muestra un cromatograma sobre gel de sílice en el que se compara el extracto de cloroformo de la zona de reacción con una muestra auténtica de (-) matairesinol^(*) u

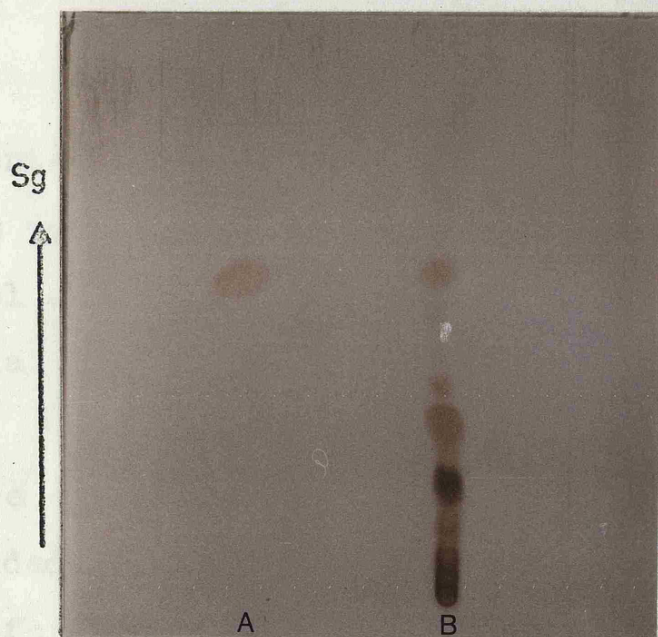


Fig. 20. Cromatograma sobre gel de sílice de matairesinol (A) y del extracto de cloroformo de la zona de reacción (B)

(*) Agradecemos sinceramente al Prof. Dr. K. Freudenberg y a su colaborador el Dr. H. Nimz del Polymer-Institut de la Universidad de Karlsruhe el envío de esta muestra.

tilizando como disolvente de desarrollo Sg IV (Tabla II, pág.68) y como revelador $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$.

El auténtico matairesinol y la sustancia que viene a la misma altura en el extracto de cloroformo de la zona de reacción y del duramen de árboles sanos presentan los mismos colores con los reveladores siguientes:

	<u>Color</u>
$\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$	rojizo
ácido fosfomolibdico	azul
ácido diazobencenosulfónico	rojizo
Folin-Ciocalteau	azul
sal de azul sólido	marrón

También presentan los mismos valores hR_f en los disolventes de desarrollo Sg II, Sg III, Sg IV, Sg V, Sg VI y Sg VII. Es por tanto muy probable que la acción inhibidora de la zona B del cromatograma del extracto de cloroformo se deba a la presencia de matairesinol.

c) El extracto de acetona no ejerce efecto inhibidor sobre el crecimiento del *Fomes annosus*. Contiene una pequeña cantidad de sustancias fenólicas que aparecen en el extracto de cloroformo junto a otras desconocidas.

Significado fitopatológico de estas investigaciones

Aparte de la zona de reacción de los árboles IV y V se

ha analizado esta zona en otros árboles procedentes de distintas estaciones forestales. Su contenido en extracto de cloroformo y su acción inhibidora varía de unas a otras. El grado de humedad oscila entre el correspondiente a la albura y el del duramen, lo que induce a pensar que la zona de reacción se forma en la albura al avanzar el patógeno, y que constituye una respuesta dinámica a la infección.

Su formación podría ser inducida por sustancias tóxicas emitidas por el hongo en su avance, como por ejemplo fomanosina, un sesquiterpeno tóxico que ha sido detectado por BASSET et. al.⁽¹³⁵⁾ en algunos cultivos de *Fomes annosus* y que al ser inyectado en las raíces de *Pinus taeda* induce la formación de una zona de reacción que contiene sustancias fenólicas, que según estos autores podrían ser pinosilvina y su éter monometílico, encontrados por SHAIN⁽⁶⁷⁾ en zonas de reacción de estos árboles naturalmente infectados.

La síntesis de los fenoles de esta zona de reacción, contenidos en el extracto de cloroformo y que podrían ser considerados como Phytoalexinas puede llevarse a cabo a partir de sustancias de reserva, tales como almidón (SHAIN⁽⁶⁷⁾). La concentración de estas sustancias de reserva está sin duda en relación con el estado de nutrición de los árboles, por lo que es muy probable que árboles de igual procedencia bajo estados de nutrición diferentes respondan de forma distinta al ataque del

hongo. Del mismo modo también influirán factores genéticos. Estas cuestiones, que ofrecen amplio campo a la investigación serán analizadas en el futuro con abetos rojos de igual material genético en los que se han provocado zonas de reacción mediante infecciones con el *Fomes annosus*. Esto permitirá el cultivo de razas más resistentes y la determinación de un tratamiento nutricional más apropiado.

La combinación de una mayor resistencia a la penetración del hongo en el líber y una mayor resistencia a la propagación de la enfermedad en la madera proporcionados no sólo por un buen material genético sino también por un estado de nutrición conveniente defenderían grandemente a los abetos rojos contra el ataque del *Fomes annosus* y los daños de la pudrición del duramen se verían reducidos.

5. Conclusiones

5. Conclusiones

Este trabajo es una contribución al estudio de la "pudrición del duramen" del abeto rojo, cuyo principal agente patógeno es el *Fomes annosus*, y está encuadrado dentro de un amplio programa que examina este problema forestal desde distintos puntos de vista.

Base de las investigaciones es la hipótesis formulada por LAATSCH que explica la relación observada entre hábitats forestales de unas características ecológicas determinadas y la mayor frecuencia con que aparece en ellos la "pudrición del duramen" como una consecuencia de la predisposición de la planta en dichos hábitats, aunque influyan también otros factores. Esta predisposición de los árboles vendría determinada por una concentración insuficiente de sustancias inhibidoras en el líber de sus raíces, como resultado de un estado de nutrición deficiente o no armónico. La existencia de sustancias inhibidoras del crecimiento del micelio del *Fomes annosus* en el líber del abeto rojo ha sido comprobada en otros trabajos; también ha sido ya llevada a cabo la identificación de las mismas.

Como hábitats forestales típicos para la "pudrición del duramen" destacan:

- aquéllos en que el suelo experimenta sequías periódicas y las raíces se encuentran muy superficiales.

- los que poseen un suelo muy rico en carbonatos o atravesado periódicamente por corrientes de agua bicarbonatada.

- los que presentan un suelo muy rico en nitrógeno.

El objeto del siguiente trabajo era la comprobación de la hipótesis anterior bajo el influjo de los factores acabados de mencionar, es decir, el estudio de la variación del efecto inhibidor del líber del abeto rojo en relación con el estado de nutrición de los árboles, bajo aquéllas condiciones ecológicas en que se suele presentar la "pudrición del duramen".

Aparte de las investigaciones sobre el líber se han realizado dos estudios en menor escala con carácter orientador, uno sobre las posibilidades que ofrece la oleorresina exudada por los árboles en orden a la resistencia de los mismos a la penetración del parásito, y el otro sobre la respuesta de la madera al ataque del patógeno.

Las conclusiones, resumen del trabajo son las siguientes:

Investigaciones sobre el líber

1ª. La acción inhibidora del líber del abeto rojo sobre el *Fomes annosus* viene determinada no sólo por su contenido en sustancias fungitóxicas, inhibidoras de su crecimiento, - compuestos resinosos y polifenoles - sino también por su concentración en sustancias favorecedoras del mismo, azúca

res , compuestos nitrogenados -.

2^a. Con el fin de conseguir una rápida estimación de los polifenoles - de donde proviene la mayor parte de la acción inhibidora del líber - en el extracto de etanol-agua del mismo se han elaborado métodos colorimétricos que permitan no solo su determinación total, sino también la de los distintos grupos afines de fenoles.

3^a. Como factores de carácter general que podían ejercer influencia sobre la acción inhibidora del líber se han examinado

- la posición de las muestras en el árbol
- la edad de los árboles
- la estación del año

a) La comparación de la composición química de los extractos del líber en las raíces medianas (0,5 a 3 cm), - órganos privilegiados para la penetración del patógeno -, y a distintas alturas en el tronco del árbol, han conducido a resultados muy semejantes, entre este tipo de raíces y el tronco a la altura de 1 m. La acción inhibidora suele ser en general ligeramente menor en las raíces como consecuencia de una concentración más pequeña de sustancias resinosas y una mayor proporción de azúcares y compuestos nitrogenados. De aquí que se puedan tomar indistintamente los valores del tronco a esa altura o de las raíces para juzgar

la resistencia del árbol.

b) La edad de los árboles no ejerce ninguna influencia sobre la composición química de los extractos del líber de las raíces del abeto rojo, ni tampoco sobre la acción inhibidora del mismo. Considerando solamente este factor no existe pues una edad privilegiada para el ataque del hongo. Teniendo en cuenta sin embargo que las raíces principalmente de los árboles jóvenes suelen presentar un grosor comprendido entre 0,5 y 3 cm., el más a propósito para la infección del hongo, la infección de ellas se transmitirá más rápidamente al tronco que en casos de árboles de mayor edad.

c) Considerando la influencia que ejerce la estación del año en la acción inhibidora del líber y la composición química de sus extractos, los árboles presentan en primavera y en el comienzo del otoño una mayor predisposición a la infección del hongo por mostrar la concentración de sustancias fungitóxicas un mínimo en esas épocas del año.

4^a. Tras el examen de estos factores, que se ha considerado necesario para poder trabajar sobre una base de comparación, se realizaron los experimentos orientados al estudio de las relaciones entre hábitats forestales y acción inhibidora

del líber del abeto rojo ,bajo aquéllas condiciones ecológi-
cas en que se suele presentar la pudrición del duramen.

- a) Para llevar a cabo el experimento que tenía por objeto es-
tudiar la influencia de la sequía del suelo sobre la acción
inhibidora del líber se produjo una sequía artificial cubrien-
do el suelo con lámina de polietileno. Esto condujo al ca-
bo de 60 días a una disminución de un 32% en el contenido
en agua de la región del suelo donde encontraban la mayoría
de las raíces.

Las consecuencias de la sequía en los árboles de la pa-
cela cubierta fueron una menor concentración de sustancias
fungitóxicas en su líber y una disminución de la acción in-
hibidora de este;asímismo una reducción del peso de sus ací-
culas y un menor contenido de potasio en las mismas.

Desde el punto de vista fitopatológico se deduce que la
resistencia de los abetos rojos a la penetración del *Fomes*
annosus será menor en tiempos de un escaso abastecimiento
de agua, lo que explica la mayor frecuencia de la pudrición
del duramen en aquéllos hábitats forestales, cuyos suelos
sufren sequías periódicas.

- b) Ya que un suelo rico en carbonatos dificulta el abasteci-
miento del abeto rojo con microelementos principalmente man

ganeso se ha estudiado la influencia de la deficiencia en este elemento sobre la acción inhibidora y la concentración en sustancias fungitóxicas del líber de los abetos rojos en dos estaciones forestales. En ambos casos se ha obtenido una menor concentración de sustancias inhibidoras en el líber de los árboles con deficiencia en este elemento , y con secuentemente también un menor efecto inhibidor sobre el crecimiento del hongo. Es pues comprensible que en esas condiciones los árboles estén especialmente predispuestos a una infección del Fomes annosus.

- c) Para estudiar la influencia de un suelo muy rico en nitrógeno sobre la acción inhibidora y la composición química de los extractos del abeto rojo se sometieron las dos parcelas determinadas para el experimento a un fuerte abonado. Otras dos parcelas colindantes se tomaron como control.

El abonado no ejerció influencia alguna sobre la acción inhibidora del líber del tronco pero sí sobre la de las raíces, la cual disminuyó notablemente.

Esta reducción de la acción inhibidora del líber de las raíces no se debe a un cambio en la concentración de sustancias fungitóxicas, -la cual presenta el mismo valor que en las parcelas control-, sino a un aumento en la concentración de compuestos nitrogenados. Particularmente notable

fue la mayor proporción de aminoácidos y, principalmente arginina. Este aminoácido puede a determinadas concentraciones favorecer el crecimiento del *Fomes annosus*.

Para concentraciones de nitrógeno superiores a unos ciertos límites la acción inhibidora del líber vuelve a crecer pero los árboles experimentan dificultades en su lignificación.

Un abonado pues con grandes cantidades de nitrógeno , - al menos entre ciertos límites -,origina árboles con una menor resistencia frente al *Fomes annosus* y por tanto más predispuestos a la "pudrición del duramen".

Ensayos con oleorresina

5^a. Se ha comprobado que la oleorresina exudada por el abeto rojo como consecuencia de heridas en la corteza inhibe el crecimiento del micelio del *Fomes annosus* en ensayos biológicos sobre agar-malta.

6^a. La exudación de oleorresina presenta un máximo en los meses de julio-agosto. En invierno es prácticamente despreciable.

Considerando los resultados obtenidos para la acción inhibidora del líber a lo largo del año (conclusión 3 c) y teniendo en cuenta que la producción de oleorresina es muy pequeña en primavera y otoño, estas épocas se presentan como

las más favorables para el ataque del hongo.

- 7^a. La producción de oleorresina es influenciada también por las sequías del suelo y por la deficiencia de los árboles en manganeso. Ambas causas producen una reducción en la exudación de oleorresina en comparación con la de los árboles tomados como control.

Ensayos con la madera

- 8^a. La madera molida de abeto rojo, tanto la procedente del dumen como la de la albura no presenta acción inhibidora en ensayos biológicos frente a *Fomes annosus*.

En algunos árboles enfermos de pudrición sin embargo se ha encontrado una zona, entre duramen enfermo y albura sana, ya mencionada por Shain, cuya madera molida inhibe el crecimiento del micelio del *Fomes annosus* produciendo en las placas Petri el típico halo pardo característico de los fenoles. No todos los árboles enfermos presentan esa zona, denominada "zona de reacción".

- 9^a. Las sustancias que originan la acción inhibidora de la zona de reacción están también presentes en el duramen de los árboles sanos, pero no en concentración suficiente para inhibir el crecimiento del micelio del *Fomes annosus* en los en-

sayos biológicos.

Entre estas sustancias se ha detectado cromatográficamente (-) matairesinol, una lignana cuya presencia en el duramen sano ya era conocida, y cuyo carácter fungitóxico había sido también comprobado.

Esta zona parece formarse como respuesta de la albura al ataque del patógeno.

6. Bibliografía

6.1 Bibliografía por orden de referencia

- (1) BJÖRKMAN, E.: Opening Remarks. En C.S. Hodges, J. Rishbeth y A. Yde-Andersen (ed.) "Proc. 3. Int. Conf. on Fomes annosus, Aarhus, 1968" pág.3. Forest Service. US Department of Agriculture, Washington, D.C. (1970).
- (2) BENITO MARTINEZ, J. y TORRES JUAN, J.: Enfermedades de las coníferas españolas. Ministerio de Agricultura, Instituto Forestal de Investigaciones y Experiencias, Madrid (1955).
- (3) SCHÖNHAR, S.: Untersuchungen über das Vorkommen von Rotfäulepilzen in Fichtenbeständen der Schwäbischen Alb. Mitt. Ver. Forstl. Standortsk. Forstpflanzenzücht. 19, 20-28 (1969).
- (4) ZYCHA, H. y ULRICH, B.: Die Rotfäule der Fichte. Sammelbericht über neue Forschungen in Deutschland. Forstar-
chiv 40, 209-212 (1969).
- (5) ZYCHA, H. y DIMITRI, L.: Ausmass und Ursache der Kernfäule in einer Fichtenprobe Fläche in Reinhausen (Nieder-
achsen). Forstw. Cbl. 87, 331-341 (1968).
- (6) SCHÖNHAR, S.: Untersuchungen über die Ausbreitung von Fomes annosus (Fr.) Cooke in Fichtenbeständen 1. Generation auf ehemaligen landwirtschaftlichen Nutzflächen. Mitt. Ver. Forstl. Standortsk. Forstpflanzenzücht. 20, 3-8 (1970).
- (7) LAATSCH, W., ALCUBILLA, M., WENZEL, G. y v. AUFSSESS, H.: Beziehungen zwischen dem Standort und der Kernfäule-disposition der Fichte (Picea abies Karst.). Forstw. Cbl. 87, 193-203 (1968).
- (8) LAATSCH, W.: Ursachen der Infektionsbereitschaft der Fichte (Picea abies Karst.) auf bestimmten Standorten. En C.S. Hodges, J. Rishbeth y A. Yde-Andersen (ed.) "Proc. 3. Int. Conf. on Fomes annosus, Aarhus, 1968" pág. 77-81. Forest Service, US Department of Agriculture, Washington, D.C. (1970).
- (9) REHFUESS, K.E.: Kernfäulebefall älterer Fichtenbestände (Picea abies) auf Standorten im Schwäbischen Alb.

En C.S. Hodges, J. Rishbeth y A. Yde-Andersen (ed.)
"Proc. 3. Int. Conf. on Fomes annosus, Arhus, 1968"
pág.96-103, Forest Service. US Department of Agriculture,
Washington, D.C. (1970).

- (10) REHFUESS, K.E.: Ernährungszustand und Kernfäulebefall älterer Fichtenbestände auf der Schwäbischen Alb. Mitt. Ver. Forstl. Standortk. Pflanzenzücht. 19, 6-19 (1969).
- (11) ALCUBILLA, M.: Pilzhemmstoffe in der Fichtenrinde. 25/I. Sonderheft zur Zeitschrift "Landwirtschaftliche Forschung", 96-101 (1970).
- (12) ALCUBILLA, M.: Extraktion, chromatographische Trennung und Isolierung von Pilzhemmstoffen des Fichtenbastes. Z. Pflanzenernähr., Bodenkde. 127, 64-74 (1970).
- (13) WENZEL, G. y DIAZ-PALACIO, M.P.: Beziehungen zwischen dem Ernährungszustand der Fichte (*Picea abies* Karst.) und der Pilzhemmstoffgehalt ihres Bastes. I. Einfluss der Austrocknung des durchwurzelten Bodenraumes. Z. Pflanzenern. Bodenkde. 127, 56-63 (1970).
- (14) ALCUBILLA, M.: Polifenoles del abeto rojo (*Picea abies* Karst.) Tesis Doctoral. Universidad de Madrid. Facultad de Ciencias
- (15) WENZEL, G., KREUTZER, K. y ALCUBILLA, M.: Beitrag zur Klärung des Zusammenhanges zwischen Standort und Pilzhemmstoffgehalt des Fichtenbastes (*Picea abies* Karst.) Forstw. Cbl. 89, 372-381 (1970).
- (16) WENZEL, G. y KREUTZER, K.: Der Einfluss des Mangansmangel auf die Resistenz der Fichten (*Picea abies*, Karst.) gegen *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. Z. Pflanzenernähr. Bodenkde. 128, 123-129 (1971).
- (17) DITTRICH, P.: Untersuchungen über den Umsatz sekundärer Pflanzenstoffe in der Nadeln von *Picea abies* L. Tesis Doctoral. Universidad de Munich, Facultad de C. (1970).
- (18) ALCUBILLA, M., DIAZ-PALACIO, M.P., KREUTZER, K., LAATSCH, W., REHFUESS, K.E. y WENZEL, G.: Beziehungen zwischen dem Ernährungszustand der Fichte (*Picea abies* Karst.) ihrem Kernfäulebefall und der Pilzhemmwirkung ihres Basts. European J. Forest Pathology (en prensa).

- (19) DIMITRI, L.: Ein Beitrag zur Infektion der Fichtenwurzel durch den Wurzelschwamm *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. Forstw. Cbl. 88, 65-132 (1969).
- (20) DIMITRI, L.: Untersuchungen über die unterirdischen Eintrittspforten der wichtigsten Rotfäuleerreger bei der Fichte (*Picea abies* Karst.). Forstw. Cbl. 88, 281-308 (1969).
- (21) BRAUN, H.J. y LULEV, J.: Infektion unverletzter fingerstarker Fichtenwurzeln durch den Wurzelschwamm *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. I. Bau des Oberflächen-Periderms und erste Infektionsbefunde. Forstw. Cbl. 88, 327-338 (1969).
- (22) BRAUN, H.J. y LULEV, J.: Infektion unverletzter fingerstarkerwurzeln durch den Wurzelschwamm *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. II. Infektionswege und Ausbreitung des Pilzes kurz nach der Infektion. Forstw. Cbl. 89, 269-275 (1970).
- (23) DIMITRI, L., ZYCHA, H. y KLIEFOTH, R.: Untersuchungen über die Bedeutung der Stbbseninfektion durch *Fomes annosus* für die Ausbreitung der Rotfäule der Fichte. Forstw. Cbl. 90, 104-117 (1971).
- (24) COURTOIS, H.: Über einige stochastische Beziehungen beim Holzabbau durch *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. Material und Organismen 3, 271-287 (1968).
- (25) COURTOIS, H. y BRAUN, H.J.: Zum Abbau manganhaltigen Fichtenholzes durch *Fomes annosus* (Fr.) Cooke, En C.S. Hodges, J. Rishbeth y A. Yde-Andersen (ed.) "Proc. 3. Int. Conf. on *Fomes annosus*, Aarhus, 1968" pag. 7-12 Forest Service. US Department of Agriculture, Washington, D.C. (1970).
- (26) BRAUN, H.J.: Untersuchungen über den Wurzelschwamm *Fomes annosus* (Fr.) Cooke. Forstw. Cbl. 77, 65-88 (1958).
- (27) FLOOD, A.E. y KIRKHAM, D.S.: The effect of some phenolic compounds on the growth and sporulation of two *Venturia* species. En J.B. Pridham (ed.) "Phenolics in Plants in Health and Disease" pag. 81-85. Pergamon Press, Oxford (1960).
- (28) OSBORNE, L.D. y THROWER, L.B.: Thiamine requirement of so-

me wood-rotting fungi and its relation to natural durability of timber. Trans. Brit. mycol. Soc. 47, 601-611 (1964).

- (29) FUCHS, W. H.: Über einige Grundbegriffe der Phytopathologie Z. Pflanzenkrankh. 55, 65-69 (1948).
- (30) WARD, H.M.: Recent researches on the parasitism of fungi. Ann. Bot. 19, 1-54 (1905).
- (31) HAWLEY, L.F., FLECK, L.C. y RICHARDS, C.A.: The relation between durability and chemical composition in wood. Ind. Eng. Chem. 16, 699-706 (1924).
- (32) RENNERFELT, E.: The natural resistance to decay of certain conifers. Friesia, 5, 361-365 (1956).
- (33) RENNERFELT, E. y NACHT, G.: The Fungicidal Activity of Some Constituents from Heartwood of Conifers. Svensk. Bot. Tidskr. 49, 419-432 (1955).
- (34) SCHEFFER, T.C. y COWLING, E.B.: Natural Resistance of Wood to microbial Deterioration. Ann. Rev. Phytopath. 4 147-170 (1966).
- (35) ANDERSON, A.B., SCHEFFER, T.C. y DUNCAN, C.G.: The chemistry of decay resistance and its decrease with heartwood aging in incense cedar (*Libocedrus decurrens* Torrey). Holzforschung 17, 1-5 (1963).
- (36) CRUICKSHANK, I.A.M.: Phytoalexins. Ann. Rev. Phytopath. 1 351-374 (1963).
- (37) ERDTMAN, H., GRIPENBERG, J. y ANDERSON, A.: Antibiotic substances from the heartwood of *Thuja plicata* D. Don. Acta Chem. Scand. 2, 625-650 (1948).
- (38) RUDMAN, P.: The causes of natural durability in timber. XI. Some tests on the fungi toxicity of wood extractives and related compounds. Holzforschung, 17, 54-57 (1963).
- (39) ERDTMAN, H.: Natural Tropolones. En K. Paech y M.V. Tracey (ed.) "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse" pag. 428-449. Springer Verlag. Berlín (1955)
- (40) RENNERFELT, E.: Observaciones no publicadas. Citado por

ERDTMAN⁽³⁹⁾.

- (41) KENNEDY, R.W.: Fungicidal Toxicity of Certain Extraneous Components of Douglas-Fir Heartwood. Forest Prod. J. 6, 80-84 (1956).
- (42) RENNERFELT, E.: The natural resistance to decay of certain conifers. Friesia, 5, 361-365 (1956).
- (43) FREUDENBERG, K. y HARTMAN, L.: Inhaltstoffe aus Robinia pseudoacacia. Naturwissenschaften, 40, 413 (1953)
- (44) ERDTMAN, H.: The chemistry of heartwood constituents of conifers and their taxonomic importance. Intern. Congr. Pure Appl. Chem. 14, 156-180 (1955).
- (45) RUDMAN, P.: The Causes of Natural Durability in Timber. XVIII. Further Notes on the Fungy Toxicity in Wood Extractives. Holzforschung, 19, 57-58 (1965).
- (46) BARNES, R.A. y GERBER, N.N.: The antifungal agent from orange wood. Am. Chem. Soc. 7, 3259-3262 (1955).
- (47) ERDTMAN, H.: Lignans. En K. Paech y M.V. Tracey (ed.) "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse" pág. 428-449 Springer Verlag, Verlag (1955)
- (48) CRUICKSHANK, I.A.M. y PERRIN, D.R.: Pathological Function of Phenolic Compounds in Plants. En J.B. Harborne (ed.) "Biochemistry of Phenolic Compounds", pág. 511-544, Academic Press, New York (1964).
- (49) LYR, H.: Detoxification of heartwood toxins and chlorophenols by higher fungi. Nature 4836, 289-290 (1962).
- (50) RYPÁČEK, V.: Biologie holzzerstörender Pilze. Fischer, Jena (1966).
- (51) PETERSON, Ch.A. y COWLING, E.B.: Decay Resistance of Extractive-Free Coniferous Woods to White-Rot Fungi. Phytopathology 54, 542-547 (1964).
- (52) MERRILL W. y COWLING, E.B.: Effect of variation in nitrogen content of wood on rate of decay. Phytopathology 55, 1067-1068 (1965).
- (53) MERRILL, W. y COWLING, E.B.: Role of Nitrogen in Wood Deterioration: Amounts and Distribution of Nitrogen in Tree Stems. Can. J. Bot. 44, 1555-1580 (1966).

- (54) LOMAN, A.A.: Bioassays of fungi isolated from *Pinus contorta* var. *latifolia* with pinosylvin, pinosylvinmonomethyl ether, pinobanksin and pinocembrin. *Can. J. Bot.* 48, 1303-1308 (1970).
- (55) ANDERSON, B.A. y SHERRAD, E.C.: Dehydroperillic acid, an acid from western red cedar (*Thuja plicata* Don.). *J. Amer. Chem. Soc.* 55, 3813 (1933).
- (56) MÜLLER, K.O. y BÖRGER, H.: Studien über den "Mechanismus" der Phytophthora-Resistenz der Kartoffel, *Landwirtsch. Jahrb. Berlin*, 87, 609 (1939).
- (57) MÜLLER, K. O. y BÖRGER, H.: Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora-Resistenz der Kartoffel. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Land- und Forstwirtschaft, Berlin*, 23, 189-231 (1940).
- (58) MÜLLER, K.O., KLINKOWSKI, M. y MEYER, G.: Physiologisch-genetische Untersuchungen über die Resistenz der Kartoffel gegenüber *Phytophthora infestans*. *Naturwissenschaften*, 27, 765-768 (1939).
- (59) MEYER, G.: Zellphysiologische Untersuchungen über die Reaktion der Kartoffelknolle auf den Angriff der *Phytophthora infestans* bei Sorten verschiedener Resistenz. *Arb. Biol. Reichsanstalt. Land- und Forstwirtschaft, Berlin*, 23, 97-132 (1940).
- (60) MÜLLER, K.O.: Einige Versuche zum Nachweis von Phytoalexinen. *Phytopatholog. Z.* 27, 237-254 (1956).
- (61) CRUICKSHANK, I.A.M., BIGGS, D.R. y PERRIN, D.R.: Phytoalexins as determinants of disease reaction in plants. *J. Indian bot. Soc. Golden Jubilee Volume*, 50A : 1-11 (1971).
- (62) ZYCHA, H.: Über die Kernbildung und verwandte Vorgänge im Holz der Rotbuche. *Forstw. Cbl.* 67, 80-109 (1948).
- (63) JORGENSEN, E.: The formation of Pinosylvin and its monomethyl ether in the sapwood of "*Pinus resinosa* Ait". *Can. J. Bot.* 39, 1765-1772 (1961).
- (64) RUDLOFF, E.v. y JORGENSEN, E.: The biosynthesis of Pinosylvin in the Sapwood of *Pinus resinosa* Ait. *Phytochemistry*, 2, 297-304 (1963).

- (65) JORGENSEN, E. y BALSILLIE, D.: Formation of heartwood phenols in callus tissue cultures of red pine (*Pinus resinosa*). Can. J. Bot. 47, 1015-1016 (1969).
- (66) LYR, H.: On the seasonal course of protection wood formation in *Pinus sylvestris* after wounding. Sixth. World Forestry Congr. (1966). Citado por SHAIN (67).
- (67) SHAIN, L.: Resistance of Sapwood in Stems of Loblolly Pine to Infection by *Fomes annosus*. Phytopathology 57, 1034-1045 (1967).
- (68) COBB, F.W. Jr., KRSTIC, M., ZAVARIN, E. y BARBER, H.W. Jr.: Inhibitory Effects of Volatile Oleoresin Componentes on *Fomes annosus* and Four *Ceratocystis* Species, Phytopathology, 58, 1327-1335 (1968).
- (69) REID, R.W. y SHRIMPTON, D.M.: Resistant response of lodge pole pine to inoculation with *Euromphium clavigerum* in different months and at different heights on stem. Can. J. Bot. 49, 349-351 (1971).
- (70) SHRIMPTON D.M. y WATSON, J.A.: Response of lodgepole pine seedlings to inoculation with *Euromphium clavigerum*, a blue stain fungus. Can. J. Bot. 49, 373-375 (1971).
- (71) KUHLMAN, E.G.: Conidiospore level necessary for stump root infection by *Fomes annosus*. Phytopathology, 59, 1168-1169 (1969).
- (72) NAIMIE, H.: Versuche zur Isolierung und Reindarstellung von *Bacillus subtilis*-Hemmstoffen aus der Eschenrinde. Tesis Doctoral. Universidad de Munich. Facultad de Ciencias (1963).
- (73) JUNG, J.: Untersuchungen über Bakterien- und Pilzhemmstoffe in höheren Pflanzen. Forstw. Cbl. 84, 96-124 (1965).
- (74) ENDRES, H.: Gerbstoffe: Chemisch technologischer Teil. En C.v. Regel (ed.) "Die Rohstoffe des Pflanzenreichs", pag. 1-162. J. Cramer, Weinheim (1962).
- (75) CUNNIGHAM, J., HASLAM, E. y HAWORTH, R.D.: The Constitution of Piceatannol. J. Chem. Soc. 2875-2883 (1963).
- (76) FREUDENBERG, K.: Lignin im Rahmen der polymeren Naturstoffe. Angew. Chem. 68, 84-92 (1956).

- (77) MUTTON, D.B.: Wood Resins. En W.E. Hillis (ed.) "Wood extractives and their Significance to the Pulp and Paper Industries" pág. 331-363. Academic Press. New York (1962).
- (78) KAHILA, S.: Paperi ja Puu, 39, 35 (1957). Cita en MUTTON⁽⁷⁷⁾.
- (79) RISHBETH, J.: Observations on the biology of Fomes annosus with particular reference to East Anglian pine plantations. III. Natural and experimental infection of pines, and some factors affecting severity of the disease. Ann. Bot. (N.S.). 15, 221-246 (1951).
- (80) VERRALL, A.F.: The probable mechanism of the protective action of resin in fire wounds on red pine. J. Forest. 36, 1231-1233 (1938).
- (81) SHAIN, L.: Resistance to infection by Fomes annosus. En O.S. Hodges, J. Rishbeth y A. Yde-Andersen (ed.) "Proc. 3. Int. Conf. on Fomes annosus, Aarhus, 1968" pág. 126-129. Forest Service. US Department of Agriculture, Washington, D.C. (1970).
- (82) HILLIS, W.E.: The Distribution and Formation of Polyphenols within the Tree. En W.E. Hillis (ed.) "Wood extractives and their Significance to the Pulp and Paper Industries, pág. 50-131, Academic Press. New York (1962).
- (83) FREUDENBERG, K.: y KNOF, L.: Die Lignane des Fichtenholzes. Chem. Ber. 90, 2857-2869 (1957).
- (84) SHAIN, L.: The Response of Sapwood of Norway Spruce to Infection by Fomes annosus. Phytopathology, 61, 301 - 307 (1971).
- (85) ROHMEDER, E.: Die Stammfäule der Fichtenbestockung. Mitt. Landesforstverwal. Bayerns. 23, (1937).
- (86) DIMITRI, L.: Untersuchungen über die Ausbreitung von Fomes annosus (Fr.) Cooke. Phytopath. Z. 48, 350-369 (1963).
- (87) WERNER, H.: Standort und Fichten rotfäule. Allg. Forstz. 22, 314-315 (1967).
- (88) ZYCHA, H. y KATO, F.: Untersuchungen über die Rotfäule der Fichte. Schriftenr. Forst. Fak. Universidad de Göttingen 39, (1967).

- (89) KRAMER, P.J.: Photosynthesis of Trees as Affected by Their Environment. En K.V. Thimann (ed.) "The Physiology of Forest Trees" pag. 174-176. Ronald Press, New York (1957).
- (90) VAADIA, Y., RANEY, F.C. y HAGAN, R.M.: Plant Water Deficits and Physiological Processes. Plant Physiol. 12, 265-292 (1961).
- (91) ZECH, W.: Kalkhaltige Böden als Nährsubstrat für Koniferen. Tesis Doctoral. Universidad de Munich. Facultad de Ciencias (1968).
- (92) ZECH, W.: Besonderheiten im Ernährungszustand chlorotischer Fichten auf kalkreichen Böden. Forstw. Cbl. 89, 1-9 (1970).
- (93) KREUTZER, K.: Manganmangel der Fichte (*Picea abies* Karst.) in Süddeutschland. Forstw. Cbl. 89, 275-299 (1970).
- (94) KREUTZER, K.: Manganmangel der Fichte (*Picea abies* Karst.) Habilitationsschrift. Universidad de Munich. Facultad de Ciencias (1970).
- (95) KRAUSS, A.: Einfluss der Ernährung der Pflanzen mit Mineralstoffen auf den Befall mit parasitären Krankheiten und Schädlingen. Z. Pflanzenern. Bodenkde. 124, 129-147 (1969).
- (96) KLEIN, E.K.: Über den Einfluss der Mineralsalzernährung auf den Gehalt des Blattes an Freien Aminosäuren und Monosacchariden und seine Bedeutung für die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber parasitären Pilzen. Bayr. Landw. Jahrbuch, 33, 224-241, 347-367 (1956).
- (97) PLANK, J.: Wirkungen der Stickstoffdüngung auf den Phenolstoffwechsel und Neigung zur Bildung von schwarzen Rost des Weizens. Chem. Zentralbl. 48, 156 (1964).
- (98) KERN, H.: Physiologische und systematische Untersuchungen in der Gattung *Leucostoma*. Phytopath. Z. 40, 303-314 (1961).
- (99) GRASSMAN, W. DEFFNER, G., SCHUSTER, E. y PAUCKNER, W.: Über den Gerbstoff der Fichtenrinde. Chem. Ber. 89, 2523-2535 (1956).

- (100) ENDRES, H.: Über die Gerbstoffe der Fichtenrinde. XV.Mitt. Gesamtanalyse de Polyhydroxyphenole des Fichtenbastes. Leder, 12, 152-157 (1961).
- (101) CRAMER, F.: Papierchromatographie. Chemie, Weinheim (1962).
- (102) WATKIN, J.E., UNDERHILL, E.W. y NEISH, A.C.: Biosynthesis of Quercetin in Buckwheat. Can. J. Biochem. 35, 229-237(1957).
- (103) HORWITZ, W.: Official Methods of Analysis of the Association of Agricultural Chemists. Washington (1955).
- (104) MORRIS, D.L.: Quantitative Determination of Carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent. Science, 107, 254-255 (1948).
- (105) EBELL, L.F.: Variation in total soluble sugars of conifer tissues with method of analysis. Phytochemistry, 8, 227-233 (1969).
- (106) MCCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V. y OWENS, H.S.: Determination of Starch and Amylose in Vegetables. Analyt. Chem. 22, 1156-1158 (1950).
- (107) GIBBS, J.N.: Resin and the Resistance of Conifers to Fomes annosus. Ann. Bot. 32, 649-665 (1968).
- (108) RUDLOFF, E.v. y SATO, A.: The heartwood extractives of Pinus banksiana Lamb. Can, J. Chem. 41, 2165-2174 (1963).
- (109) GERICKE, S. y KURMIES, B.: Colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat (VM-Methode). Z. analyt. Chem. 137, 15-22 (1952).
- (110) SANDELL, E.B.: Colorimetric Determination of traces of metals. Interscience publishers.Inc. New York (1950).
- (111) KJELDAHL, J.: Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. Z. analyt. Chemie 22, 366-382 (1883).
- (112) MÜLLER, W. y FIEDLER, H.J.: Zur Bestimmung des Gesamtstickstoffs in Boden- und Pflanzenmaterial nach der Kjeldahl-Methode. Arch. Forstwes. 18, 945-956 (1969).

- (113) LAATSCH, W.: Das Abschätzen der Wasserversorgung von Waldbeständen auf durchlässigen Standorten ohne Grund- und Hangzugwasser. I. Leicht durchlässige Standorte Forstw. Cbl. 88, 257-271 (1969).
- (114) LAATSCH, W.: Das Abschätzen der Wasserversorgung von Waldbeständen auf durchlässigen Standorten ohne Grund- und Hangzugwasser. II. Böden mit vorübergehender Staunässe (Parabraunerden). Forstw. Cbl. 88, 351-358 (1969).
- (115) THORNWAITE, C.W. y MATHER, J.R.: Instructions and tables for computing evapotranspiration and water balance. Drexel Institute of Technology. Laboratory of climatology Vol.3. Nr.3. Centerton. New Jersey (1957).
- (116) JEREMIAS, K.: Speicherungsphysiologische Untersuchungen bei *Picea abies* und *Sequoiadendron giganteum*. Mitt. Ver. Forstl. Standortsk. Forstpflanzenzücht. 19, 58-66 (1969).
- (117) SWAIN, T. y GOLDSTEIN, J.L.: The quantitative Analysis of Phenolic Compounds. En J.B. Pridham (ed.) "Methods in polyphenol Chemistry" pag. 131-146. Pergamon Press. Frankfurt (1964).
- (118) SEIKEL, M.K.: Isolation and Identification of Phenolic Compounds in Biological Materials. En J.B. Harborne "Biochemistry of phenolic Compounds" pag. 32-76, Academic Press, London (1964).
- (119) JUNG, J. y HUBBES, M.: Growth inhibition of *Bacillus cereus* in vitro by glycosidal substances extracted from bark of *Fraxinus*. Can. J. Bot. 43, 469-474 (1965).
- (120) PLATT, W.D., COWLING, E.B. y HODGES, C.S.: Comparative Resistance of Coniferous Root Wood and Stem Wood to Decay by Isolates of *Fomes annosus*. Phytopathology, 55, 1347-1353 (1965).
- (121) ENDRES, H. y MERKLE, K.: Über die Gerbstoffe der Fichtenrinde. XII. Isolierung und Konstitutions-ermittlung eines Piceatannol-monoglucosides. Chem. Ber. 94, 419-431 (1961).
- (122) SCHLICHTING, E. y BLUME, H.P.: Bodenkundliches Praktikum. Parey, Hamburg y Berlin, (1966).

- (123) HODGES, J.D. y LORIO, P.L. Jr.: Carbohydrate and nitrogen fractions of the inner bark of loblolly pines under moisture stress. *Can. J. Bot.* 47, 1651-1657 (1969).
- (124) KREUTZER, K.: Der Einfluss der Mangan-Applikation auf die Pigment- und Nährelementgehalte manganarmer Fichtennadeln. *Z. Pflanzenern. Bodenkde.* 127, 84-91 (1970).
- (125) RISHBETH, J.: Observations on the biology of *Fomes annosus* with particular reference to East Anglia pine plantations. I. The outbreaks of disease and ecological status of the fungus. *Ann. Bot.* 14, 365-383 (1950).
- (126) DURZAN, D.J.: Nitrogen metabolism of *Picea glauca*. III. Diurnal changes of amino acids, amides, protein and chlorophyll in leaves of expanding buds. *Can. J. Bot.* 46, 929-937 (1968).
- (127) MOTHES, K.: Physiologische Untersuchungen über das Asparagin und das Arginin in Coniferen. *Planta*, 7, 585-649 (1929).
- (128) DURZAN, D.J. y STEWARD, F.C.: The Nitrogen Metabolism of *Picea glauca* (Moench) Voss and *Pinus banksiana* Lamb. as influenced by Mineral Nutrition. *Can. J. Bot.* 45, 695-710 (1967).
- (129) BARNES, R.L. y BENGTON, G.W.: Some Aspects of Nitrogen Nutrition and Metabolism in Relation to Fertilizer Responses in Southern Pines. Symposium on Forest Fertilization, Gainesville, Florida, 1967. Publicaciones del National Fertilizer Development Center pag. 58-63 (1968).
- (130) TROMP, J.: Storage and Mobilization of Nitrogenous Compounds in Apple Trees with Special Reference to Arginine. En L.C. Luckwill y C.V. Cutting (ed.) "Physiology of Tree Crops", pag. 143-159. Academic Press London (1970).
- (131) EBELL, L.F. y Mc MULLAN, E.E.: Nitrogenous substances associated with differential cone production responses of Douglas fir to ammonium and nitrate fertilization. *Can. J. Bot.* 48, 2169-2177 (1970).

- (132) COWLING, E.B. y MERRILL, W.: Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. Can. J. Bot. 44, 1539-1554 (1966).
- (133) FARKAS, G.L. y KIRALY, Z.: Role of Phenolic Compounds in the Physiology of Plant Diseases and Disease Resistance. Phytopath. Z. 44, 15-150 (1962).
- (134) ZIMMERMANN, M.H.(ed.): The Formation of Wood in Forest Trees. Academic Press, New York (1964).
- (135) NILSSON, P.O. y HYPPEL, A.: Studier över rötangrepp i sårskador hos gran. Sv. Skogsvardsf. Tidskr. 66, 675-713 (1968).
- (136) BASSET, C., SHERWOOD, R.T., KEPLER, J.A. y HAMILTON, P.B.: Production and Biological Activity of Fommanosin, a Toxic Sesquiterpene Metabolite of Fomes annosus. Phytopathology, 57, 1046-1052 (1967)

6.2 Índice alfabético de autores(*)

ALCUBILLA, M.: 11,12,14.

ALCUBILLA, M., DIAZ-PALACIO, M.P., KREUTZER, K., LAATSCH, W.,
REHFUESS, K.E. y WENZEL, G.: 18.

ANDERSON, A.B., SCHEFFER, T.C. y DUNCAN, C.G.: 35.

ANDERSON, A.B. y SHERRAD, E.C.: 55.

BARNES, R.L. y BENGTON, G.W.: 129.

BARNES, R.A. y GERBER, N.N.: 46.

BASSETT, C., SHERWOOD, R.T., KEPLER, J.A. y HAMILTON, P.B.: 136.

BENITO MARTINEZ, J. y TORRES JUAN, J.: 2.

BJÖRKMAN, E.: 1.

BRAUN, H.J.: 26.

BRAUN, H.J. y LULEV, J.: 21,22.

COBB, F.W., KRSTIC, M., ZAVARIN, E. y BARBER, H.W. Jr.: 68

COURTOIS, H.: 24.

COURTOIS, H. y BRAUN, H.J.: 25.

COWLING, E.B. y MERRILL, W.: 132.

CRAMER, F.: 101.

CRICKSHANK, I.A.M.: 36.

CRUICKSHANK, I.A.M., BIGGS, D.R. y PERRIN, D.R.: 61.

CRUICKSHANK, I.A.M. y PERRIN, D.R.: 48.

CUNNINGHAM, J., HASLAM, E. y HAWORTH, R.D.: 75.

(*) Los números corresponden a las citas del apartado 6.1

DIMITRI, L.: 19,20,86.

DIMITRI, L., ZYCHA, H. y KLIEFOTH, R.: 23.

DITTRICH, P.: 17.

DURZAN, D.J.: 126.

DURZAN, D.J. y STEWARD, F.C.: 128.

EBELL, L.F.: 105.

EBELL, L.F. y Mc MULLAN, E.E.: 131.

ENDRES, H.: 74,100.

ENDRES, H. y MERKLE, K.: 121.

ERDTMAN, H.: 39,44,47.

ERDTMAN, H., GRIPENBERG, J. y ANDERSON, A.: 37.

FARKAS, G.L. y KIRALY, Z.: 133.

FLOOD, A.E. y KIRKHAM, D.S.: 27.

FREUDENBERG, K.: 76.

FREUDENBERG, K. y HARTMAN, L.: 43.

FREUDENBERG, K. y KNOF, L.: 83.

FUCHS, W.H.: 29.

GERICKE, S. y KURMIES, B.: 109.

GIBBS, J.N.: 107.

GRASSMAN, W., DEFFNER, G., SCHUSTER, E. y PAUCKNER, W.: 99.

HAWLEY, L.F., FLECK, L.C. y RICHARDS, C.A.: 31.

HILLIS, W.E.: 82.

HODGES, J.D. y LORIO, P.L. Jr.: 123

HORWITZ, W.: 103

JEREMIAS, K.: 116.

JORGENSEN, E.: 63.

JORGENSEN, E. y BELSILLIE, D.: 65.

JUNG, J.: 73.

JUNG, J. y HUBBES, H.: 119.

KAHILA, S.: 78.

KENNEDY, R.W.: 41.

KERN, H.: 98.

KJELDAHL, J.: 111.

KLEIN, E.K.: 96.

KRAMER, P.J.: 89.

KRAUSS, A.: 95.

KREUTZER, K.: 93,94,124.

KUHLMAN, E.G.: 71.

LAATSCH, W.: 8,113,114.

LAATSCH, W. ALCUBILLA, M., WENZEL, G. y v.AUFSESS, H.: 7.

LOMAN, A.A.: 54.

LYR, H.: 49,66.

McCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V. y OWENS, H.S.: 106.

MEYER, G.: 59.

MERRILL, W. y COWLING, E.B.: 52, 53.

MORRIS, D.L.: 104.

MOTHES, K.: 127.

MÜLLER, K.O.: 60.

MÜLLER, K.O. y BÖRGER, H.: 56,57.
MÜLLER, K.O., KLINKOWSKI, M. y MEYER, G.: 58.
MÜLLER, W. y FIEDLER, H.J.: 112.
MUTTON, D.B.: 77.
NAIMIE, H.: 72.
NILSSON, P.O. y HYPPEL, A.: 135.
OSBORNE, L.D. y THROWER, L.B.: 28.
PETERSON, Ch.A. y COWLING, E.B.: 51.
PLANK, J.: 97.
PLATT, W.D., COWLING, E.B. y HODGES, C.S.: 120.
REHFUESS, K.E.: 9,10.
REID, R.W. y SCHRIMPTON, D.M.: 69.
RENNERFELT, E.: 32,40,42.
RENNERFELT, E. y NACHT, G.: 33.
RISHBETH, J.: 79,125.
ROHMEDER, E.: 85.
RUDLOFF, E.v. y JORGENSEN, E.: 64.
RUDLOFF, E.v. y SATO, A.: 108
RUDMAN, P.: 38,45
RYPACEK, V.: 50.
SANDELL, E.B.: 110.
SCHEFFER, T.C. y COWLING, E.B.: 34.
SCHLICHTING, E. y BLUME, H.P.: 122.
SCHÖNHAR, S.: 3,6.

SEIKEL, M.K.: 118.

SHAIN, L.: 67, 81, 84.

SCHRIMPTON, D.M. y WATSON, J.A.: 70.

SWAIN, T. y GOLDSTEIN, J.L.: 117.

THORNWAITE, C.W. y MATHER, J.R.: 115.

TROMP, J.: 130.

VAADIA, Y., RANEY, F.C. y HAGAN, R.M.: 90.

VERRALL, A.F.: 80.

WARD, H.M.: 30.

WATKIN, J.E., UNDERHILL, E.W. y NEISH, A.C.: 102.

WENZEL, G. y DIAZ-PALACIO, M.P.: 13.

WENZEL, G. y KREUTZER, K.: 16.

WENZEL, G., KREUTZER, K. y ALCUBILLA, M.: 15.

WERNER, H.: 87.

ZECH, W.: 91, 92.

ZIMMERMANN, M.H.: 134.

ZYCHA, H.: 62.

ZYCHA, H. y DIMITRI, L.: 5.

ZYCHA, H. y KATO, F.: 88.

ZYCHA, H. y ULRICH, B.: 4.